COLETANEA

DO

I. T. A.

VOL. 3, 1969-70

COLETÂNEA
DO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CFTRI
Mr.

VOLUME 3

1969/1970

CFTRI LIBRARY
MYSORE-2
13 DEC 1974

Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo
Campinas - São Paulo - Brasil

CONTEÚDO

1. Avaliação da eficiência do sistema de purificação de esgôto e resíduos pela DBO e DQO

Tobias J. Barreto de Menezes 1

2. Fontes de contaminação microbiana na industrialização da Banana: I - Matéria-prima

Ana Maria Cruvinel e Fumio Yokoya 17

3. Aplicação de vários ênzimos proteolíticos no amaciamento de carnes

Y.K.Park e Yacy Y. Draetta 29

4. Métodos de hidrólise das proteínas em alimentos para determinação de aminoácidos

Iovaldo B. Figueiredo 41

5. Avaliação sensorial de novos clones de mandioca

Leda Maria Pupo, Maria Amélia Chaib, Yara Tosello e Ruth S. Garrutti 57

6. Produção de xarope de glicose do amido de mandioca pelo método ênzimo-ênzimo

Yong K. Park e Renato S. Papini 65

7. Observações sobre a composição do óleo essencial da casca de algumas variedades de citros

Iovaldo B. Figueiredo e João S. Tango 75

8. O cálcio no vinho: Causas de enriquecimento e meios de eliminação

Takuo Hashizume 87

9. Inibição de *Pseudomonas putrefaciens* por *Streptococcus diacetilactis* e *Leuconostoc citrovorum*

José Sátiro de Oliveira 115

10. Fatôres que afetam o crescimento e a fermentação malo-láctica de *Leuconostoc citrovorum*

Tobias J. B. de Menezes 129

11. Influência da fonte de carboidrato sobre a produção de alfa-amílase fúngica

Y. K. Park 187

12. Influência do nitrogênio orgânico sobre a produção de alfa-amílase fúngica

Y. K. Park 191

13. Estudo da atividade de alfa-amílase por diversos microrganismos

Y. K. Park 195

14. Obtenção de produto de mandioca substituto da raspa

Policarpo Vitti 201

15. Armazenamento de feijão-de-mesa

Braz Antonio Jordão e Sérgio R. Stolf 217

16. Armazenamento de café beneficiado a granel em silo com ventilação natural

Braz Antonio Jordão, Ruth S. Garrutti, Eidiomar Angelucci, João S. Tango e Yara Tosello 253

17. Composição do fruto e do óleo de diferentes variedades de abacate cultivadas no Estado de São Paulo

João S. Tango, Sebastião Irineu da Costa, Aloísio José Antunes, Iovaldo Bueno Figueiredo 283

18. Emprego da farinha de milho pré-gelatinizada em bôlo e bolacha

Policarpo Vitti 293

19. Deterioração da castanha-do-pará: I - Armazenamento das amêndoas

Fumio Yokoya, Aloísio J. Antunes e Braz Antônio Jordão 313

20. Comparação da capacidade de sintetizar aflatoxina entre vários fungos do gênero *Aspergillus*

Hatuê Nakamura e Fumio Yokoya 337

21. Processamento da farinha de milho pré-gelatinizada, seu emprego e resultados na panificação

Werner Horst Bär 351

22. Resistência térmica e caracterização *Vibrio parahaemolyticus* por electroforese em gel de sobrenadantes de culturas

Mauro Faber de Freitas Leitão 369

23. Curva de saturação do feijão-de-mesa variedade Rosinha

Braz Antônio Jordão e Sérgio R. Stolf 425

24. Estudos preliminares sobre o processamento do palmito da palmeira babaçu

Zeno De Martin, Cyro G. Teixeira, Ernesto Bleinroth, Valdemiro C. Sgarbieri, Tobias J. B. de Menezes e José Pio Nery 435

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/70

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO SISTEMA DE PURIFICAÇÃO DE ESGÔTO E RESÍDUOS PELA DBO E DQO

Tobias J. Barreto de Menezes

RESUMO

A eficiência do processo de depuração dos resíduos de esgôto e despejo das diversas usinas de processamento do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos, foi avaliada por meio da determinação química e bioquímica do oxigênio consumido. Amostras de resíduos brutos e semipurificados, foram coletadas dentro de um período de dez horas, durante o transcurso de um dia, em três anos consecutivos.

Os resultados mostraram que a maior eficiência do tratamento foi observada em 1964. Nos dois anos subseqüentes, a taxa de decomposição da matéria-orgânica não foi suficientemente alta para atender o acúmulo de resíduos no tanque digestor, provenientes das diversas unidades de processamento.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, por meio da equação de regressão linear, a fim de se estabelecer as relações entre a DBO e DQO.

SUMMARY

EVALUATION OF THE PURIFICATION EFFICIENCY OF WASTES BY BOD AND COD. *The efficiency of the purification process of the sewage and wastes from the processing*

plants of the Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos, was estimated by the Chemical and Biochemical Oxigen Demand. Raw and treated samples were collected over a ten hour period during the day on three sucessive years.

The results shawed that the highest efficiency of treatment was observed in 1964. In the following years the decomposition rate of organic material was not sufficient to overcome the acumulation of wastes coming from the processing plants into the digestion tank.

The data was statiscally analysed by the regression line equations to determine the relation between the BOD and COD methods.

INTRODUÇÃO

Com a crescente expansão industrial do País, o problema relacionado com a produção dos resíduos industriais vem agravando-se cada vez mais. A poluição dos cursos de água por descarga dêsses resíduos, implica em sérios prejuízos, que podem resultar no aumento da mortalidade dos peixes e da flora aquática, assim como em dificuldades na purificação dessa água para consumo humano e utilização industrial.

Os dois métodos utilizados para avaliar a "fôrça polucional" dessas águas, têm sido a DBO e a DQO, sendo o primeiro considerado pela maioria dos pesquisadores, como o melhor para a avaliação do grau de poluição (2). Entretanto, vários pesquisadores têm procurado aperfeiçoar a DQO com a finalidade de substituir aquêle na prática, tendo em vista as vantagens que apresenta, no tocante aos resultados que podem ser conhecidos dentro de algumas poucas horas, além de não necessitar de equipamentos que comumente não são disponíveis em laboratórios de processamento de alimentos (3). MC MILLAN e outros (2), estabeleceram comparações entre ambos os métodos usados para

avaliar o processo de purificação da vinhaça das destilarias de conhaque, mostrando a utilidade de se exprimir a DBO em têrmos da DQO, não só pela praticabilidade do método, como também pela obtenção dos resultados em menor espaço de tempo.

Embora êsses autores não pretendam a substituição da DBO, justificam o emprêgo da DQO, como medida de contrôle, em muitas situações de rotina. Todavia, seria necessária, para isso, a obtenção de dados suficientes que permitissem estabelecer uma relação entre ambos os métodos.

O presente trabalho teve por finalidade verificar a eficiência do sistema de depuração dos resíduos atualmente empregados no CTPTA, pela DBO e DQO, e estabelecer, por método estatístico, a relação existente entre os dois processos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os resíduos das diversas unidades do CTPTA, compreendem os despejos das usinas-pilotos de alimentos, óleo e fermentações industriais, da cantina e dos laboratórios, que constituem, conjuntamente com os do esgôto, o resíduo combinado. Êste sofre uma depuração num sistema de tratamento que, em linhas gerais, consiste no seguinte:

Uma caixa de grades, para reter os sólidos em suspensão; um tanque digestor, no qual se realizam os processos naturais de decomposição, fermentação e putrefação; uma caixa de acumulação, para receber a descarga do tanque digestor, que a retém por um breve período de tempo, antes de ser lançada na lagoa de oxidação, para ali completar as transformaçoes finais; uma câmara de sedimentação, para a deposição do lôdo, material resultante das transformações ocorridas no tanque digestor; um leito de secagem, onde o lôdo é lançado periòdicamente.

Foram tomadas cêrca de 36 amostras do resíduo combinado, no período de 1964 a 1966. A coleta das amostras foi efetuada durante um dia, a intervalos de duas horas, simultâneamente nas entradas da Câmara de Digestão e da Caixa de Acumulação, amostras estas designadas por resíduo bruto e resíduo semitratado, respectivamente.

A demanda bioquímica do oxigênio foi determinada em triplicata nas amostras, pelo método de Winkler modificado (2), utilizando-se garrafas-padrão de 300 ml. Na execução do método, não houve necessidade de se introduzir a semeadura na água de diluição, uma vez que as próprias amostras continham uma população suficiente de microrganismos, proporcionada pelo componente esgôto.

A demanda química do oxigênio também foi determinada em triplicata, pelo método de Mercer-Rose modificado, empregando-se 12 minutos como tempo de digestão.

Uma solução de 1 g/ℓ de glicose-padrão, incluída no teste com a finalidade de aferir o método e os reagentes analíticos, forneceu em cinco amostras, uma DQO média de 994 p.p.m., o que está bem próximo do valor de 996 p.p.m., encontrado por outros pesquisadores (2).

Foram determinados o coeficiente de correlação (r), o êrro-padrão de estimativa e as equações de regressão (1).

RESULTADOS

Os resultados das determinações efetuadas nas amostras de resíduo bruto e de resíduo semitratado (Figuras 1, 2 e 3), indicam que a DBO variou nos diferentes anos, como durante o mesmo dia da coleta. Também pôde ser observado que a DBO para o resíduo semitratado, na entrada da Câmara de Acumulação, aumentou

no decorrer do primeiro ano, o que indica um aumento na descarga, em conseqüência de maior atividade das usinas-pilotos. Entretanto, o valor da DBO mais elevado, de 520 p.p.m., foi encontrado para o resíduo bruto (Figura 3). Êste valor não ultrapassou muito aquêles normalmente encontrados para os resíduos de esgôto. Possìvelmente, naquele dia, resíduos de difícil oxidação estavam diluídos na água residual, ou então as usinas que operam com produtos que fornecem resíduos de alta DBO, como a Usina-Pilôto de Destilados ou a Usina-Pilôto de Alimentos, não estavam em plena atividade.

Os valores da DBO nos anos de 1965 e 1966, foram mais altos para o resíduo semitratado, na entrada da Câmara de Acumulação, do que para o resíduo bruto. A fim de se avaliar a capacidade depuradora do tanque digestor em um dia, calculou-se o múltiplo da diferença entre as DBO médias do resíduo bruto e o semitratado, determinada no período de dez horas e à vazão diária de 190 mil litros, prevista pelo projeto. Assim procedendo, verificou-se que para o ano de 1964,28 quilos de DBO foram consumidos pelo tanque digestor, enquanto que excessos de 5,2 e 3,6 quilos deveriam ser consumidos para manter no mesmo nível a DBO do resíduo semitratado, nos anos de 1965 e 1966, respectivamente. É possível que o acúmulo de material residual na Câmara de Digestão, tenha dificultado a decomposição da matéria-orgânica.

Relação DBO e DQO. As Figuras 4 e 5, mostraram que tanto o resíduo bruto como o semitratado, na Câmara de Acumulação, coletados em 1966, apresentam uma tendência para os valores da DQO acompanharem os valores da DBO. Um paralelismo semelhante, também foi observado nos anos subseqüentes.

Os dados da DQO e os valores correspondentes da DBO, para o resíduo bruto, podem ser vistos na Figura 6.

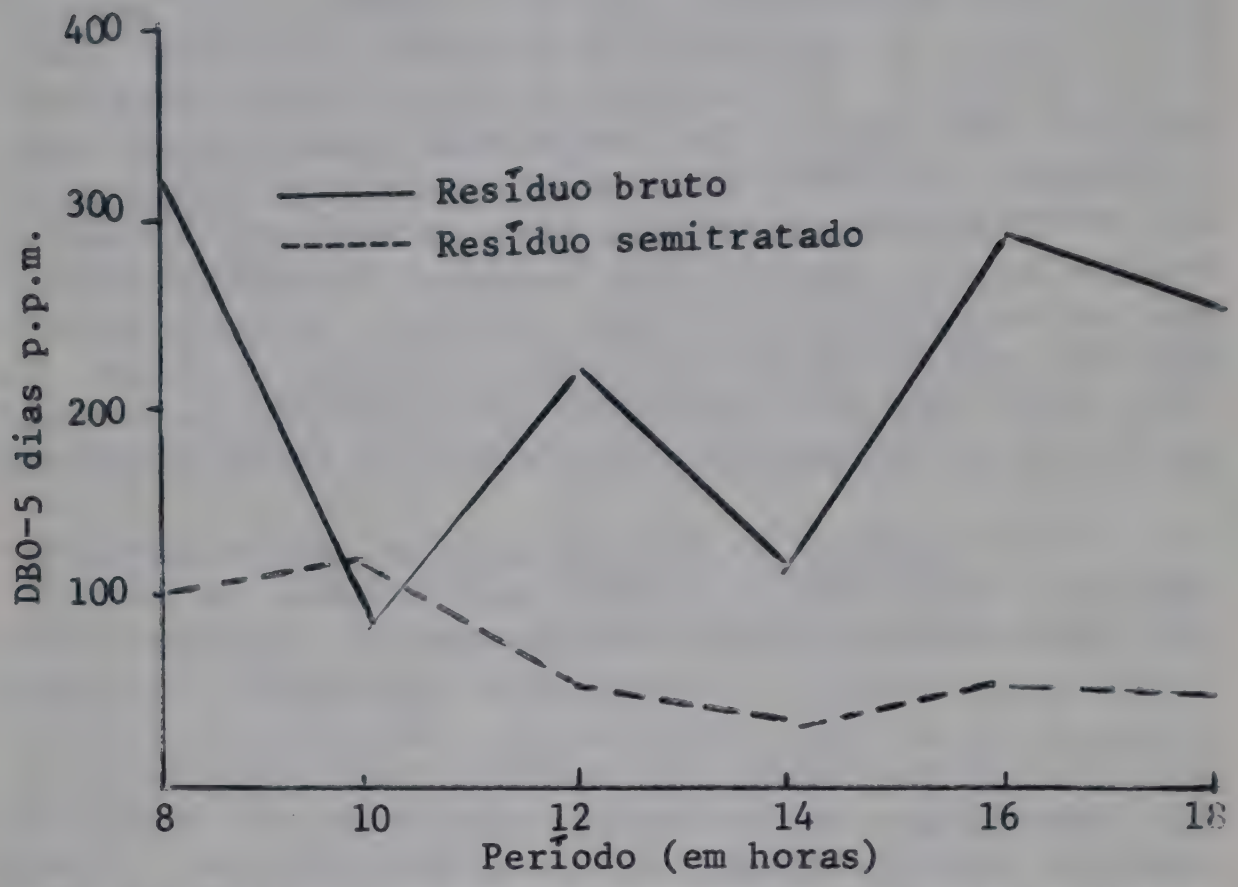


Figura 1. Eficiência do tratamento da câmara de digestão - 1964.

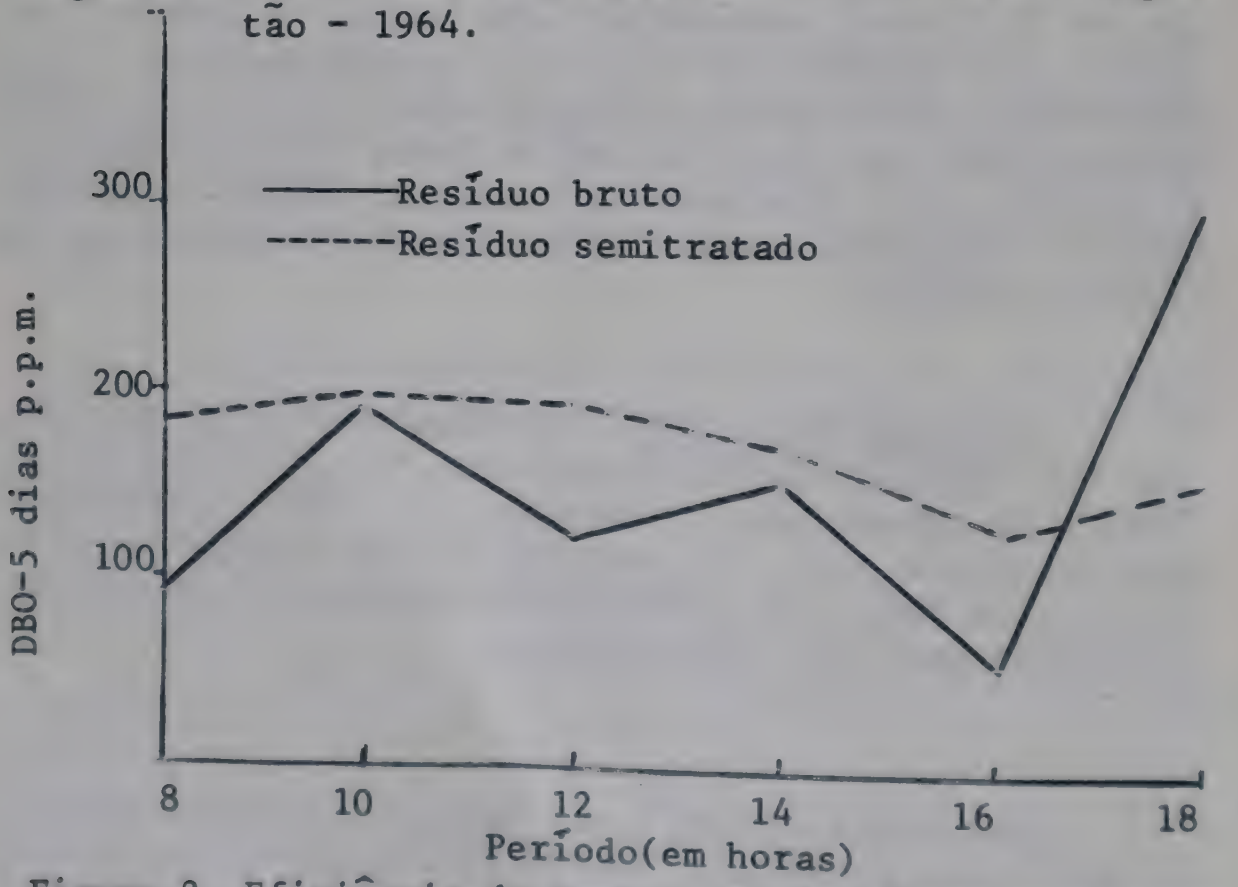


Figura 2. Eficiência do tratamento da câmara de digestão - 1965.

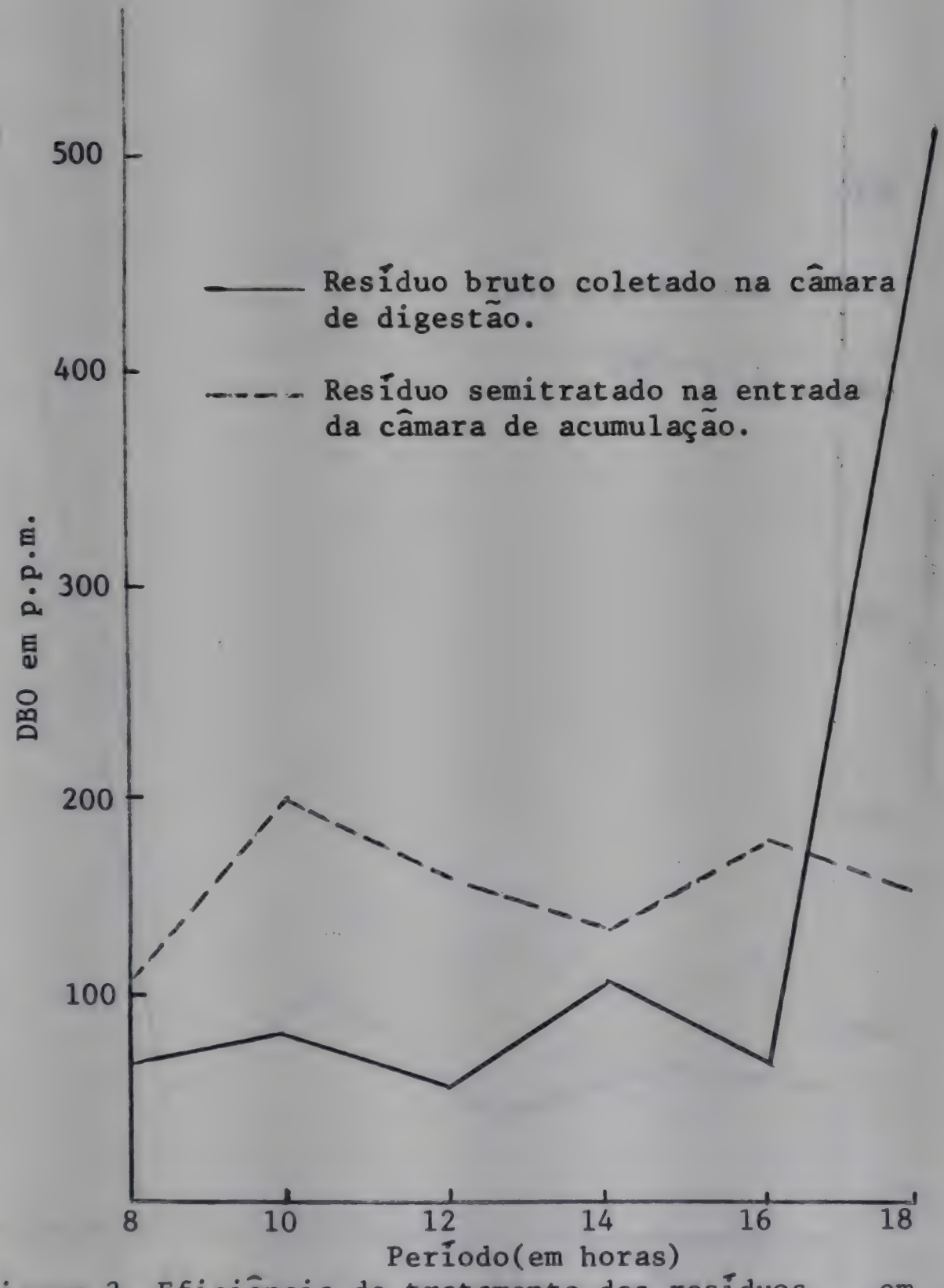


Figura 3. Eficiência do tratamento dos resíduos em 1966.

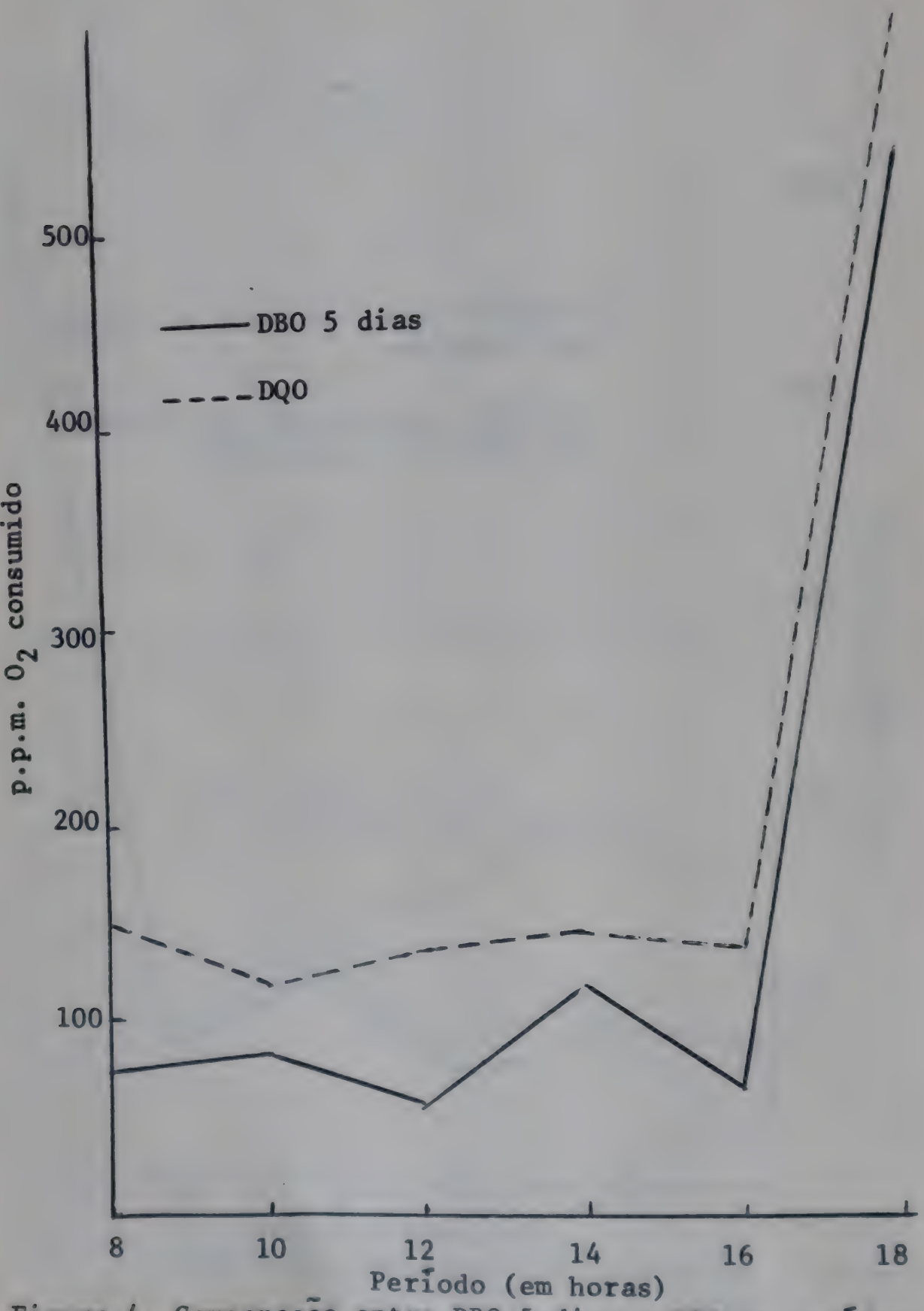


Figura 4. Comparação entre DBO 5 dias e DQO do resíduo bruto - 1966.

O coeficiente de correlação para os 18 pares de amostras foi de 0,88, significativo a 1,0% de probabilidade. O êrro-padrão da estimativa foi de 47.

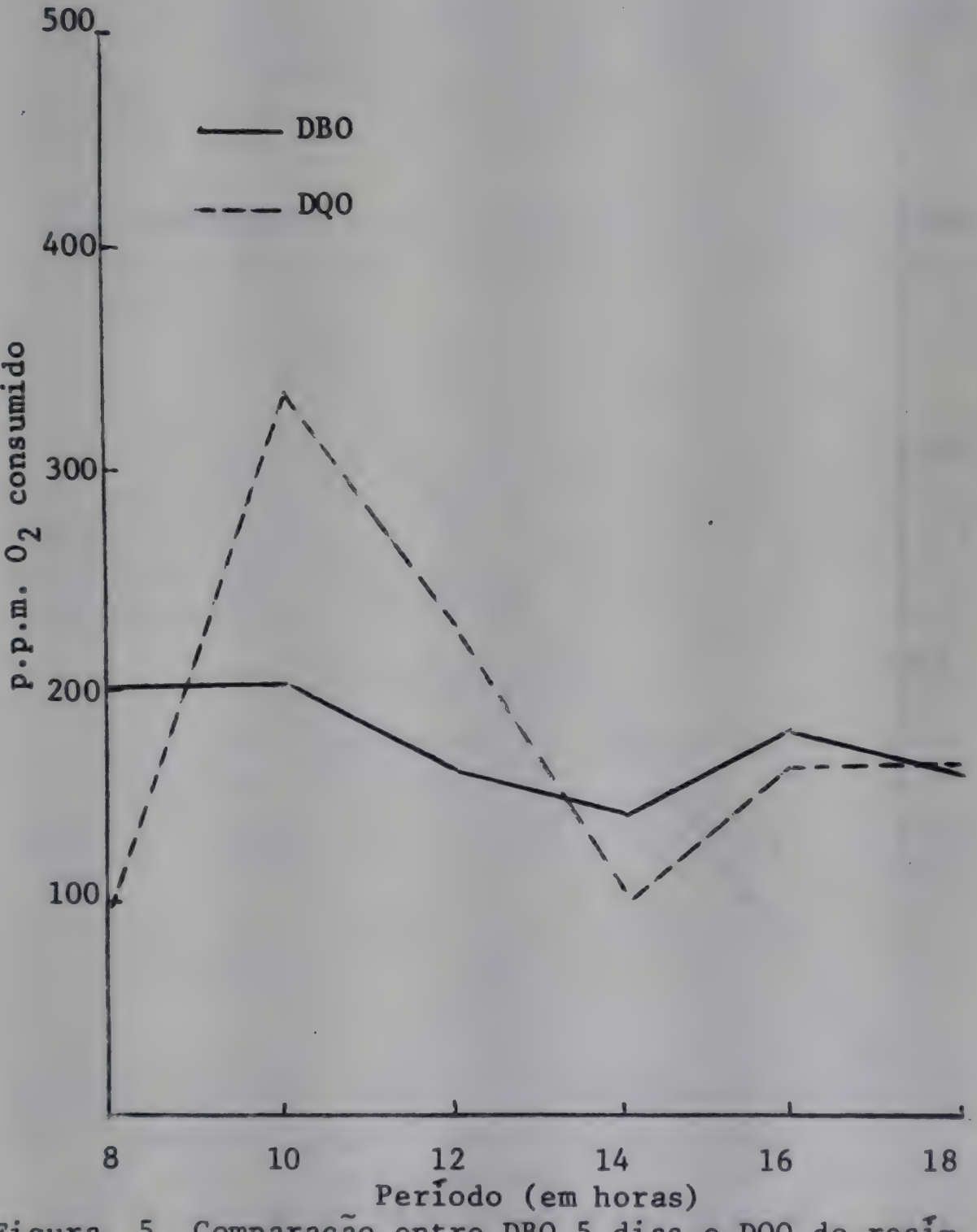


Figura 5. Comparação entre DBO 5 dias e DQO do resíduo semitratado - 1966.

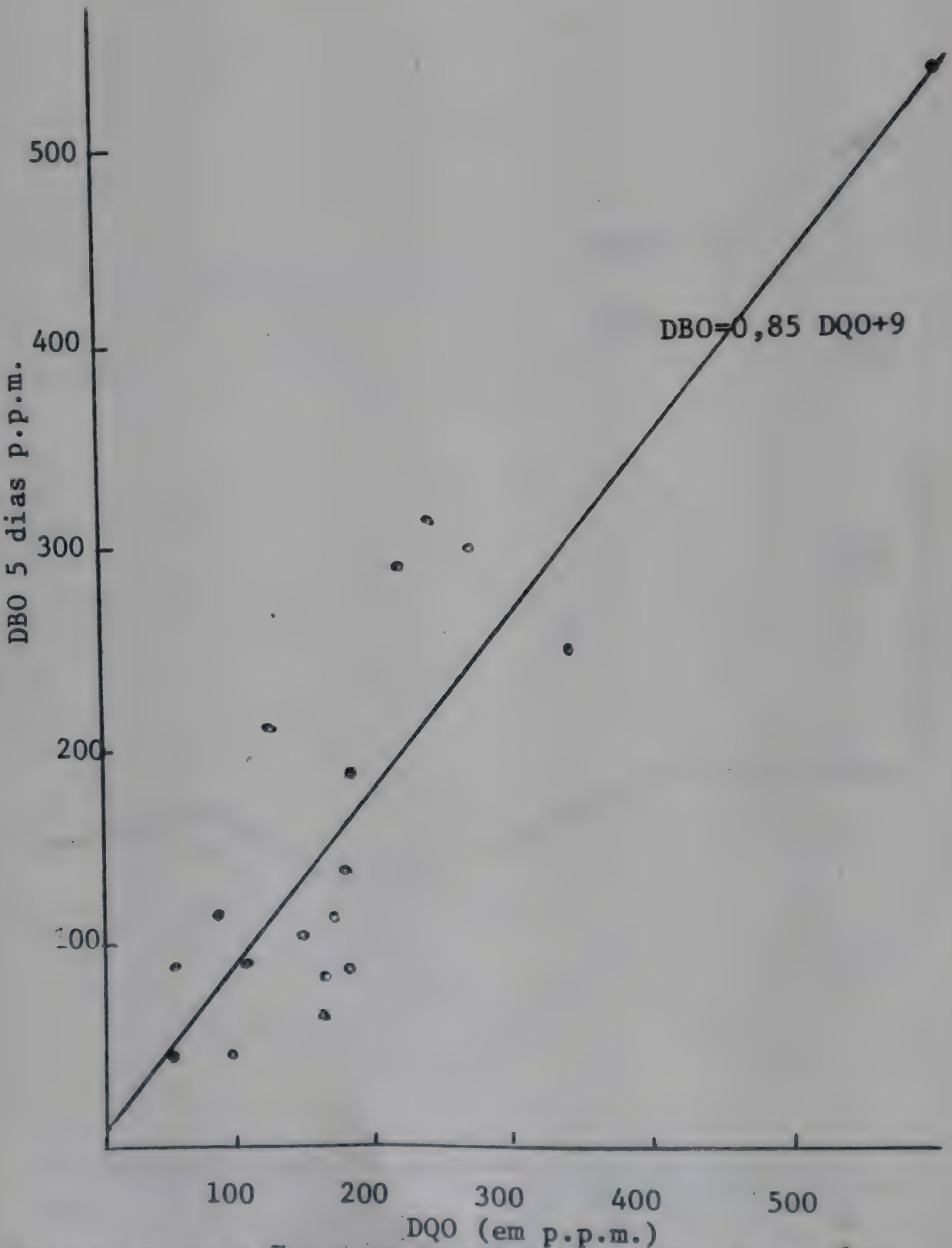


Figura 6. Relação entre DBO-5 dias Vs DQO do resíduo bruto.

Conseqüentemente, as determinações da DQO podem ser utilizadas para avaliar os valores da DBO do resíduo não tratado, pela seguinte equação de regressão linear:

$$DBO = 0,85\ (DQO) + 9$$

A Figura 7 representa a relação entre a DBO e a DQO do resíduo, na entrada da Câmara de Acumulação. O coeficiente de correlação para os 18 pares de amostras, foi de 0,84, significativo a 1,0% de probabilidade.

A DBO para êste resíduo pode ser analisada pelos dados da DQO, com o emprêgo da equação de regressão linear:

$$DBO = 0,52\ (DQO) + 76$$

Os dados que correlacionam os valores da DBO e DQO, quando o resíduo bruto e o semitratado foram analisados em conjunto, estão representados na Figura 8. Independentemente do tipo de resíduo, a DBO pode ser avaliada pelos valores da DQO, aplicando-se a equação:

$$DBO = 0,69\ (DQO) + 46$$

Os dados referentes às análises estatísticas, estão resumidos no Quadro 1.

Quadro 1. Resumo da avaliação estatística dos dados da DBO e DQO.

Tipo de resíduo	n	$\frac{DBO}{DQO}$	r	s	a	b
Resíduo bruto	18	0,89	0,88	47	0,85	9
Semitratado	18	1,08	0,84	35	0,52	76
Ambos (Análise conjunta)	36	0,97	0,85	50	0,69	46

(*) n = número de amostras; r = coeficiente de correlação; s = êrro-padrão; a = inclinação da reta de regressão; b = intersecção da linha de regressão, em que DBO = a (DQO) + b.

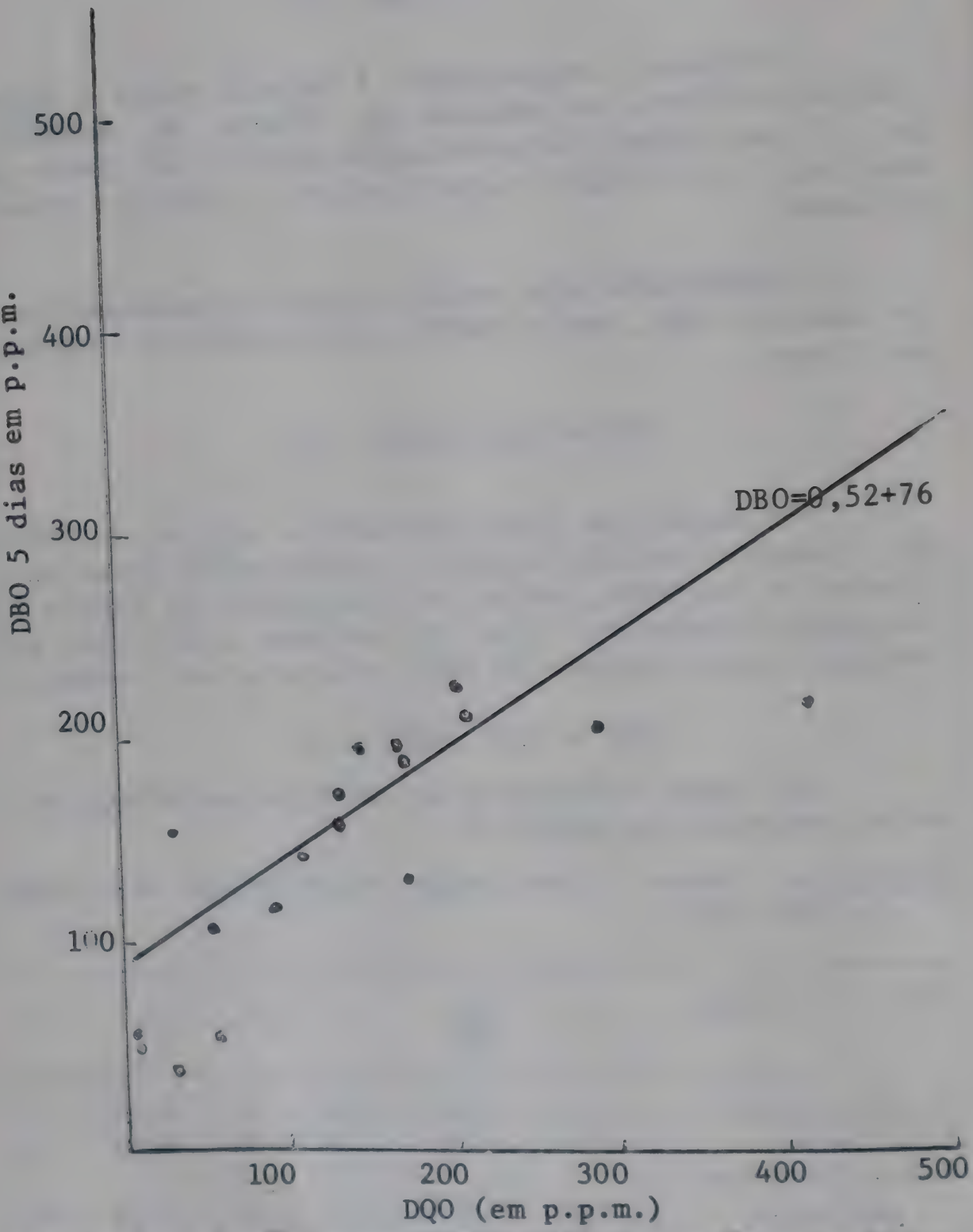


Figura 7. Relação entre DBO Vs DQO do resíduo semitratato.

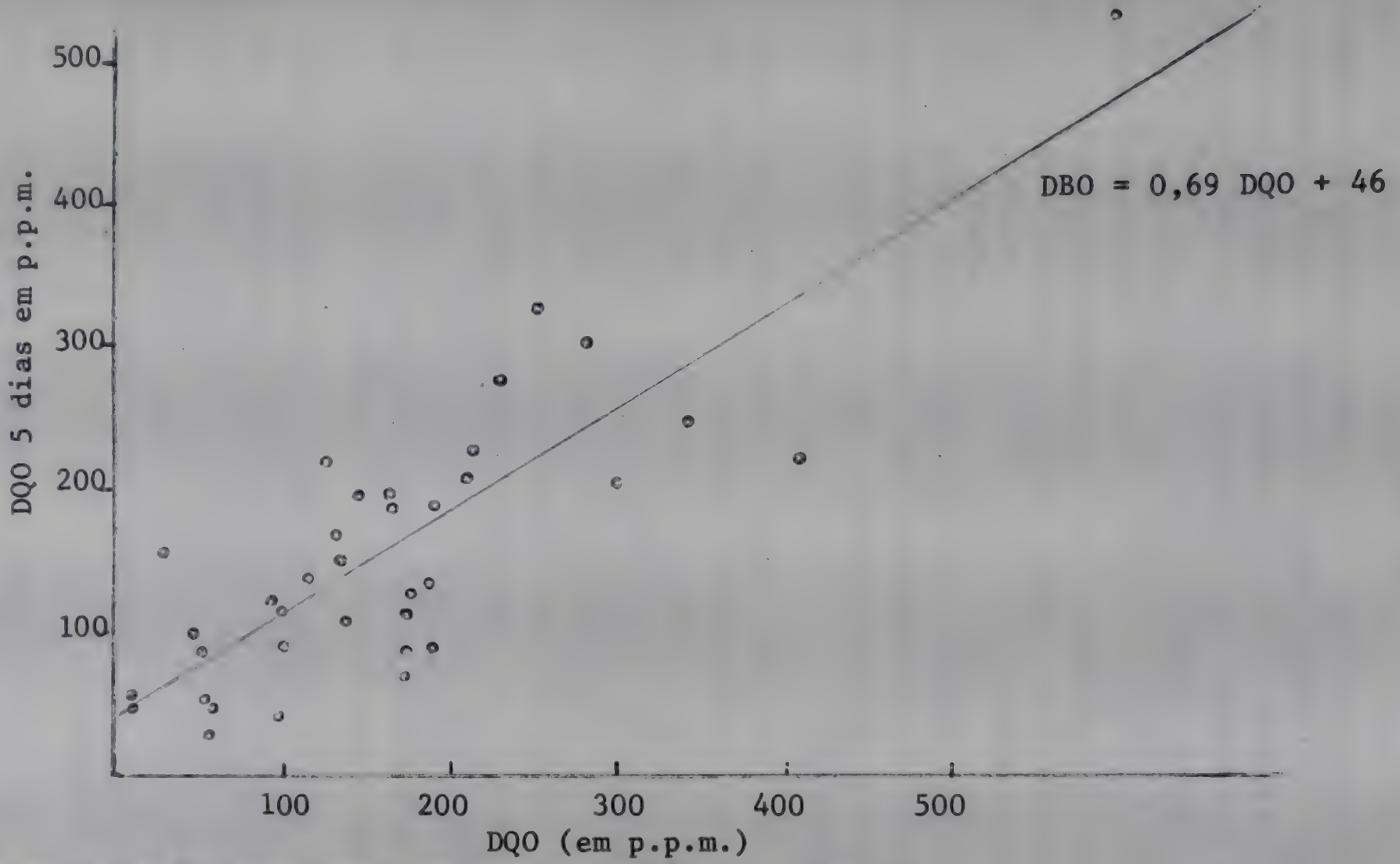


Figura 8. Relação entre DBO Vs DQO do resíduo combinado.

DISCUSSÃO

É evidente que o aumento da fôrça polucional ascendeu consideràvelmente de 1964 a 1966. Comparando-se as Figuras 1, 2 e 3, nota-se que maior eficiência no tratamento foi conseguida no ano de 1964, uma vez que quase todos os valores da DBO do resíduo na entrada da Câmara de Acumulação estavam abaixo dos valores obtidos para o resíduo bruto. Embora o inverso tenha sido constatado nos dois anos subseqüentes, o valor de 250 p.p.m. para a DBO - o mais alto obtido na Caixa de Acumulação - não parece ser muito elevado, uma vez que o tratamento final se completaria na Lagoa de Oxidação. Porém, não se pode prever qual será a eficiência do tratamento, nos próximos anos, quando irão entrar em funcionamento as novas usinas-pilotos de processamento.

Até o ano de 1966, ainda não haviam sido obtidos valores extremamente elevados da DBO, o que normalmente ocorre quando se analisa um tipo particular de despejo. Em um levantamento (5) realizado em várias fábricas de processamento de frutas e vegetais, em que foram analisados os resíduos de diversos produtos, os valores da DBO encontrados para os resíduos de tomate, milho e chucrute, atingiram números da ordem de 1.500, 4.000 e 60.000, respectivamente. Os autores verificaram que, embora os métodos de processamento tenham pouco efeito na relação DBO/DQO, o tipo de produto exerce uma influência considerável.

Determinações em série de DBO e DQO dos resíduos provenientes de cada usina de processamento, serão úteis no sentido de se estabelecer relações entre ambos os métodos e, também, para informar como êles contribuem para a formação da fôrça polucional, e quais os problemas que adviriam, caso fôssem despejados em cursos de água.

Deve-se acentuar, contudo, que as relações aqui obtidas entre a DBO e DQO, sòmente serão válidas para aquelas condições. Qualquer modificação, seja

pela introdução de novos tipos de resíduos ou pelo aumento no despejo da matéria-orgânica das usinas de operação nos próximos anos, poderá afetar sensivelmente essa relação, tornando necessário o estabelecimento de outras relações. Os resultados, entretanto, indicam que a DQO é um método eficiente para se avaliar os valores da DBO, podendo ser empregado nas indústrias de alimentos como meio para medir a fôrça polucional dos seus resíduos.

LITERATURA

1. GOMES, P. Curso de estatística experimental. Universidade de São Paulo, 2a. edição, 1963.

2. MAC MILLAN, J.D., YORK II, G.K. & VAUGHN, R. H. BOD vs. COD Methods for the Determination Brandy Purification. Am. J. Enol. Viticult. 10, (4): 199-205, 1959.

3. MERCER, W.A. & ROSE, W.W. Chemical Oxygen Demand as a Test of Strength of Cannery Waste Water National Canners Association. Research Laboratory Report, Berkley, California, nº816-56-B, 1956.

4. NATIONAL CANNERS ASSOCIATION RESEARCH LABORATORIES. *In* Laboratory Manual for Food Canners and Processors. The AVI Publishing Company, INC., 3th ed., p. 345-359, 1968.

5. SPLITISTOESSER, D.F. & DOWNING, D.L. Analisys of Effluents from Fruit and Vegetables Processing Factories. New York State Agriculture Experiment Station, Geneva, Research Circular nº 17, 1969.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol 3, 1969/70

FONTES DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA NA INDUSTRIALIZAÇÃO DA BANANA: I - MATÉRIA-PRIMA

Ana Maria Cruvinel (*)
Fumio Yokoya

RESUMO

Foi feito o estudo microbiológico das bananas colhidas nas diversas regiões de bananicultura do Estado de São Paulo, em relação à incidência das bactérias que causam problemas à industrialização. Os seguintes grupos de bactérias foram investigados: total de bactérias, bactérias termófilas, bactérias esporogênias, aeróbias e anaeróbias facultativas e bactérias anaeróbias termófilas. O número total de bactéria foi da ordem de 3 x 10^5 por grama, número de bactérias esporogênias, ácidos tolerantes de 10 a 300 por grama e o número de bactérias termófilas de 2 a 70 esporos por 100 gramas de produto. Essas bactérias termófilas examinadas mostraram ser tôdas pertencentes ao grupo das bactérias produtoras de deterioração ácida (Bacillus coagulans).

SUMMARY

SOURCE OF MICROBIAL CONTAMINATION IN BANANA PRODUCTS: I - FRUIT SURFACE CONTAMINATION. *The study was conducted to find out the microbial load in the raw material used for the banana processing industries. The results indicated that the total microbial contamination was*

(*) Estagiária-bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

about 3 x 10^5 cells per gram of the product, mesophilic acid tolerant sporeformers, 10 to 300 per gram, and thermophiles 2 to 70 per 100 gram. Theses thermophiles were all belonging to the flatsour group (Bacillus coagulans).

INTRODUÇÃO

A banana é uma cultura importante em muitas regiões do Brasil, nas quais o solo e as condições climáticas são favoráveis à sua produção. Porém, a sua expansão tem sido limitada pela falta de mercado. O produto é colocado à venda em estado natural e, como tal, o mercado fica restrito ao consumo interno e a uma pequena exportação ao Uruguai e à Argentina, principalmente.

Uma expansão no mercado externo está restrita, ainda, ao fato de as variedades mais comumente cultivadas, "nanica" e "nanicão", não permitirem o transporte dos frutos a longa distância, em seu estado natural. Assim, no auge da colheita, enfrenta-se um problema de aparente superprodução. Um dos recursos possíveis à solução dêsse problema será por meio da industrialização, pela qual a fruta poderá alcançar outros mercados externos, principalmente da Europa.

Atualmente, os produtores de banana estão muito interessados na possibilidade de industrialização da banana para exportação. Um produto que vem tendo boa aceitação no mercado mundial é o "purê de banana", o qual está sendo fabricado na América Central com relativo sucesso (4).

No Brasil, o Instituto de Tecnologia de Alimentos, em Campinas, desenvolveu uma técnica para produção de "purê acidificado de banana", com relativo sucesso, empregando variedades locais da fruta. Não se sabe, entretanto, se o tratamento térmico dado a êsse produto era suficiente para obter uma "esterilização

comercial". É, portanto, de grande interêsse conhecer a microflora que acompanha a matéria-prima, a fim de se obter dados para avaliação do processamento correto. Além disso, outros produtos, como banana em pó, banana-passa, banana congelada, etc. requerem estudos mais aprofundados para que a qualidade seja uniforme e boa.

Êste trabalho apresenta os resultados dos ensaios realizados para determinar o número de bactérias de interêsse no processamento, presentes na matéria-prima que é colhida nas principais regiões de bananicultura do Estado de São Paulo. Os seguintes grupos de bactérias foram estudados, quanto ao seu número, nas diversas amostras: 1) número total de bactérias; 2) número de bactérias termófilas; 3) número de bactérias aeróbias ácido-tolerantes; 4) número de bactérias anaeróbias termófilas.

Por se tratar de bactérias mais importantes na industrialização, foi feita a identificação das diversas linhagens de bactérias termófilas.

MATERIAL E MÉTODO

As amostras de banana foram colhidas ou obtidas nas regiões de Santos, Biguá, Registro e no entreposto da CEAGESP, em São Paulo. Tôdas as frutas estavam no estado normal da colheita, ou seja, 3/4 gorda.

As amostras foram transportadas ao laboratório, logo após a colheita, em sacos plásticos, e conservadas na geladeira até o momento dos exames. O período máximo de armazenamento na geladeira foi de duas semanas.

Para as determinações microbiológicas, cêrca de 700 g do produto foram colocados em igual quantidade de água esterilizada, em um frasco de vidro de 5 litros, prèviamente esterilizado. Após a colocação das amostras e água, o frasco foi agitado várias vêzes durante um período de 1 minuto, para se obter a

suspensão bacteriana, seguindo-se de um repouso durante cêrca de 15 minutos. O frasco foi, a seguir, novamente agitado, e após um repouso de 3 a 5 minutos, foram retiradas alíquotas do líquido, com pipetas esterilizadas, procedendo-se nelas as contagens bacterianas.

As seguintes contagens foram efetuadas:

1. Número total de bactérias. Feito segundo o método recomendado pela National Canners Association (5);

2. Número total de bactérias termófilas. Determinado segundo o método do número mais provável, em meio de glicose-triptona-extrato de levedura, inoculando-se as quantidades de 10, 1 e 0,1 ml da suspensão (5 tubos cada). O número mais provável foi determinado pela tabela apresentada pelo APHA (6). A incubação foi feita a 55ºC durante 48 horas.

3. Número de bactérias esporogênias aeróbias e anaeróbias facultativas ácido-tolerantes. A suspensão bacteriana foi inicialmente aquecida a 60ºC durante 20 minutos, para eliminação das formas vegetativas, e a contagem de esporos foi feita no meio Thermoacidurans ágar (3), após incubação durante 48 horas a 37ºC.

4. Número de bactérias anaeróbias termófilas. A suspensão bacteriana aquecida do item 3 foi inoculada em meio de carne de porco-ervilha (1) contendo 0,6% de ácido sórbico para inibição dos anaeróbios facultativos (7). Foram feitas três séries de inoculação (10, 1 e 0,1 ml), 5 tubos para cada série.

A classificação das bactérias termófilas foi feita de acôrdo com o método recomendado pela NCA (5). Por microscopia de fase em montagem úmida constatou-se quanto à formação dos esporos, os tipos de esporos, os tipos de esporângios e a localização dos esporos.

Usando-se a coloração de Gram, foram verificados, por microscopia simples, a reação de Gram e o tamanho das células.

A determinação das temperaturas máximas e mínimas de crescimento foi feita no meio nutriente ágar - Difco (3), com adição de glicose e bromocresol púrpura. As temperaturas testadas foram de 30, 37, 55 e 60ºC.

As reações bioquímicas testadas foram: 1) produção de ácido e gás a partir de glicose; 2) hidrólise do amido; 3) hidrólise da gelatina; 4) hidrólise da caseína; 5) utilização de citrato; 6) produção de acetoína; 7) redução de nitrato e 8) crescimento em anaerobiose. Os métodos usados para êsses testes foram aquêles do Manual de NCA (5).

RESULTADOS

O número dos grupos de bactérias mais comumente envolvidos na deterioração dos alimentos enlatados estão apresentados nos Quadros 1, 2, 3 e 4, respectivamente para as amostras de Guarujá, Registro, Biguá e do entreposto da CEAGESP-São Paulo. O número total de bactérias foi relativamente constante, apresentando-se, em média, 3×10^5 células por grama do produto. O número de bactérias esporogênias mesófilas ácido-tolerantes foi de 10 a 45 esporos por grama de banana, exceto para as amostras de Biguá, que apresentaram uma quantidade aproximadamente 10 vêzes mais alta, isto é, em média, de 300/g.

O número de bactérias termófilas encontrado foi de 2 a 70 esporos em cada 100 g do produto. Os números mais altos foram observados nas amostras de Guarujá (em média, 68/100 g) e, os menores, nas amostras de Registro.

Foram isoladas 47 linhagens de bactérias termófilas que foram submetidas aos testes de identificação. O resultado das reações estão apresentados no

Quadro 5. O diâmetro médio das células foi de 0,5 a 0,6 μ, e o comprimento de 1,5 a 2,0 μ. Com exceção de uma linhagem, tôdas as demais apresentaram reação Gram-positiva. Essas bactérias hidrolisaram amido, caseína e gelatina. Tôdas produziram acetoína e cêrca de 2/3 das linhagens desenvolveram-se em meio de citrato, como única fonte de carbono e energia. Nenhuma linhagem reduziu nitrato e tôdas se desenvolveram em anaerobiose, assim como a 30ºC, porém menos intensamente do que a 37ºC. O desenvolvimento a 55ºC foi bastante lento e não houve nenhum desenvolvimento a 60ºC. Tôdas as linhagnes produziram ácido, mas não gás, a partir de glicose. Não foi constatada a presença de anaeróbios termófilos pelas técnicas empregadas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O número de bactérias presentes na banana colhida em diversas regiões do Estado de São Paulo não variou muito, sendo da ordem de 3×10^5 por grama do produto. Êsse número era cêrca de 5 vêzes menor do que aquêle constatado em tomate (trabalho não publicado).

O número de bactérias esporogênias aeróbias e anaeróbias facultativas, de 10 a 300/por grama foi, em média, 10 vêzes maior do que no tomate. O número de bactérias termófilas do grupo de "deterioração ácida" ("flat sour") foi igual ou ligeiramente maior àquele encontrado no tomate.

Os testes bioquímicos das linhagens de bactérias termófilas isoladas, mostraram ser estas pertencentes ao grupo *Bacillus coagulans*. Em contraste com as linhagens mencionadas nas literaturas, tôdas se desenvolveram a 30ºC.

LITERATURA

1. ANDERSEN, A.A. A rapid method of counting spores of *Clostridium botulinum*. Jour. Bacteriology 62: 426-432, 1951.

2. DE MARTIN, Z., SGARBIERI, V., MENEZES, T.J.B. de, LEITÃO, M.F.F. & GARRUTI, R.S. Produção de purê de banana acidificado e néctar de banana. Coletânea 1: 273-298, 1965-66.

3. DIFCO MANUAL. Laboratory Media. 9th Ed. Difco Lab. Inc., Detroit, Mich, USA, 1953.

4. LAWLER, F.K. Banana challenges food formulators. Food Eng. 39 (5): 58-63, 1967.

5. NATIONAL CANNERS ASSOCIATION. Laboratory Manual for Food Canners and Processors. AVI-Publishing Co., Westport, Conn., Vol. 1, 1968.

6. SHARF, J.M. Recommended methods for the examination of foods. American Public Health Assn., 1965.

7. YORK, G.K & VAUGHN, R.H. Resistance of *Clostridium parabotulinum* to sorbic acid. Food Res. 20: 60-65, 1955.

Quadro 1. Contagem dos principais grupos de bactérias de banana, da região de Guarujá. Média de duas determinações.

Amostra e Variedade	Total de bactérias ($n^o/gx10^3$)	Bactérias esporuladas (n^o/g)	Termófilas ($n^o/100g$)	
			Aeróbias	Anaeróbias
1. Nanicão	160	11	83	0
2. Nanicão	170	11	110	0
3. Nanicão	240	6,8	31	0
4. Nanicão	240	13	22	0
5. Nanicão	250	3,0	150	0
6. Nanicão	210	5,9	18	0
7. Nanicão	290	5,9	96	0
8. Nanicão	220	20	34	0
9. Nanicão	270	19	66	0
Média	230	10,6	68	0
Máximo	290	20	150	-
Mínimo	160	5,9	18	-

Quadro 2. Contagem dos principais grupos de bactérias de bananas da região de Registro. Média de duas determinações.

Amostra e variedade	Total de bactérias (n^o/g x 10^3)	Bactérias esporuladas (n^o/g)	Termófilas (n^o/100g)	
			Aeróbias	Anaeróbias
1. S. Mateus	180	79	1,3	0
2. Leite	300	39	3,1	0
3. Nanica	200	80	0,0	0
4. Ouro	210	15	0,0	0
5. Caru Verde	190	10	1,5	0
6. Falta Velhaca	250	120	10	0
7. Nanica	310	18	1,4	0
8. Nanicão	320	110	10	0
9. Ouro Bahia	300	11	1,5	0
10. Nanica	250	9	3,2	0
11. Nanica	360	5	0,0	0
12. Nanica	270	5	0,0	0
Média	270	42	2,7	0
Máximo	360	120	10	-
Mínimo	180	5	0,0	-

Quadro 3. Contagem dos principais grupos de bactérias de bananas da variedade Nanicão na Região de Biguá. Média de duas determinações.

Amostra e tratamento	Total de bactérias ($n^o/g \times 10^3$)	Bactérias esporuladas (n^o/g)	Termófilas ($n^o/100g$)	
			Aeróbias	Anaeróbias
1. Testemunha	240	610	120	0
2. Testemunha	280	730	28	0
3. Testemunha	240	190	17	0
4. Óleo	170	150	58	0
5. Óleo	180	400	31	0
6. Óleo e Maneb	110	100	25	0
7. Óleo e Maneb	140	140	15	0
8. Óleo e Maneb	110	63	16	0
Média	190	300	39	0
Máximo	280	730	120	-
Mínimo	110	63	15	-

Quadro 4. Contagem dos principais grupos de bactérias das amostras de banana da variedade Nanicão obtida na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP).

Amostra	Total de bactérias ($n^o/g \times 10^3$)	Bactérias esporuladas (n^o/g)	Termófilas ($n^o/100$ g)	
			Aeróbias	Anaeróbias
1	260	9,6	70	0
2	350	15	25	0
3	190	60	210	0
4	420	18	23	0
5	380	60	33	0
6	380	29	23	0
7	430	110	23	0
8	260	52	23	0
Média	300	44	53	0
Máximo	420	110	210	-
Mínimo	26	9,6	23	-

Quadro 5. Característica das 47 bactérias termófilas isoladas das amostras de banana.

Testes nº s	REAÇÕES	RESULTADOS
1	Tamanho das células em mícrons	Diâmetro médio = 0,5 - 0,6 Comprimento médio = 1,5 - 2,0
2	Coloração de Gram	Gram-positivo = 46 Gram-negativo = 1
3	Hidrólise de amido	Hidrólise positiva = 47 Hidrólise negativa = 0
4	Hidrólise da caseïna e gelatina	Hidrólise positiva = 47 Hidrólise negativa = 0
5	Formação de acetoïna	Voges-Proskawer positivo = 47 Voges-Proskawer negativo = 0
6	Utilização de citrato	Crescimento positivo = 29 Crescimento negativo = 18
7	Redução de nitrato	Redução positiva = 0 Redução negativa = 47
8	Crescimento em anaerobiose	Crescimento positivo = 47 Crescimento negativo = 0
9	Temperatura de crescimento	30°C - 47 (++) 37°C - 47 (+++) 55°C - 47 (+) 60°C - 0
10	Reação em caldo glicosado	Produção de ácido = 47 Produção de gás = 0

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos. Vol. 3, 1969/70

APLICAÇÃO DE VÁRIOS ÊNZIMOS PROTEOLÍTICOS NO AMACIAMENTO DE CARNES

Y. K. Park
Yacy Y. Draetta

RESUMO

Foi investigado o efeito de ênzimos proteolíticos no músculo de gado. Músculo semitendinoso foi liofilisado, pulverizado e 0,5 g dêle, dissolvido numa solução enzímica e incubado a 30-90ºC durante 15 minutos. Depois de filtrado, o conteúdo de aminoácidos de 1,0 ml do filtrado foi determinado pela reação com o reagente de Folin-Cioralteau.

Para estudos histológicos, blocos de tecidos liofilizados com dimensões de 0,5 x 0,5 x 1,0 cm foram preparados e mergulhados em solução enzímica, durante 5 horas e à temperatura ambiente. Após êsse tempo, os blocos foram fixados em solução de formalina a 10%, seguindo-se da preparação de lâminas histológicas.

Dêste modo, foram determinados os ênzimos que atacam, mais eficientemente o músculo, tendo-se verificado que a ficina é mais eficiente, seguindo-se, pela ordem, a papaína, promelina, protéase bacteriana e tripsina.

SUMMARY

APPLICATION OF SEVERAL PROTEOLITIC ENZYMES INSOFTENING OF CATTLE MUSCLE. *The effect of proteolytic enzymes on the muscle of cattle was investigated. Semi-*

tendinous muscle was lyophilized, powdered and 0,5 gm dissolved in an enzyme solution, and incubated at 30-90ºC for 15 minutes. After filtration the amino acid content of 1,0 ml of the filtrate was determined by a color reation, using the Folin-Ciocalteau reagent.

For histological studies a bloc, of lyophilized tissue meassuring 0,5 x 0,5 x 1,0 cm was prepared and infused in enzyme solution, holding for 5 hours at room temperature. After 5 hours it was fixed with 10% formalin and a slide prepared.

In this way, we determined the following enzymes efficiently attacked the muscle, the most efficient being ficin, followed by papain, bromelin, bacterial protease and trypsin in that order.

INTRODUÇÃO

Se bem que a aplicação de vários ênzimos proteolíticos para amaciamento de carnes venha sendo amplamente utilizada, êsses produtos ainda não foram lançados comercialmente no Brasil.

Trabalhos anteriores mostraram que um certo número de ênzimos proteolíticos podem solubilizar as proteínas da carne e que existe um certo grau de seletividade entre êsses ênzimos ao solubilizarem as diferentes frações das proteínas (TAPPEL e outros, (10); WANG e outros (12). A papaína parece afetar mais as mucoproteínas e o colágeno do que outras proteínas do tecido ósseo (McINTOSH e outros (7). Tôdas as frações das proteínas das carnes são totalmente solubilizadas s em pH = 7 a 80ºC, pela ficina e bromelina(Al-GHARBAWI e outros, (3). A ficina, bromelina e papaína não podem hidrolisar o colágeno natural. Êste pode ser decomposto por ênzimos sòmente depois de ter sido desnaturado pelo aquecimento, pela variação de pH, ou pela alta concentração de sais (HINRICHS (4). A papaína, ficina, bromelina e tripsina mostraram ser boas

agentes de hidrólise da proteína solúvel da carne. A papaína e a ficina hidrolisaram a elastina, ao passo que a bromelina, ficina, tripsina e papaína, hidrolisam o colágeno (MIYADA (8).

Embora seja evidente que alguns ênzimos proteolíticos possam solubilizar as proteínas da carne, ainda não foi esclarecido como a temperatura afeta a hidrólise enzímica da proteína, e qual a relação entre o grau dessa hidrólise e o aspecto morfológico da carne.

Os objetivos dêste trabalho foram: 1) verificar o efeito da temperatura sôbre a hidrólise enzímica das proteínas da carne; 2) estudar a relação entre o grau de hidrólise enzímica das proteínas e suas variações morfológicas; 3) verificar qual o ênzimo que ataca mais eficientemente a proteína muscular da carne de gado vacum.

MATERIAIS E MÉTODO

Materiais. Os ênzimos usados neste trabalho foram: ficina, papaína, bromelina, protéase bacteriana e tripsina. A ficina foi obtida do látex de *Ficus carica*, pelo método descrito em REED (9). A papaína foi extraída do látex de *Carica papaia*. IAC-16M, pelo método descrito por BALLS e outros (1) e BECKHORN (2). A bromelina foi extraída do suco do miolo do abacaxi, pela precipitação com acetona HEINICKE e outros. (4). A protéase bacteriana foi fornecida pelo Miles Laboratory, Alkhart, Indiana, E.U.A. A tripsina foi obtida comercialmente.

Músculo semitendinoso de boi recentemente foi liofilisado, cortado em pedaços e a seguir triturado. Outra porção do músculo liofilisado foi cortado em pequenos blocos (1,0 cm x 0,5 cm x 0,5 cm) para exames histológicos.

Método. As atividades proteolíticas de todos os ênzimos foram determinadas pelo método baseado na digestão de uma solução de caseína tamponada (pH = 7,4), durante 35 minutos a 40ºC, seguido de sua precipitação e filtração. A quantidade de caseína dissolvida foi medida colorimètricamente (6, 11). As atividades proteolíticas dos ênzimos sôbre a caseína encontram-se no Quadro 1.

Preparam-se, com água destilada, soluções de cada ênzimo a 1,1%; 10 ml de cada solução de ênzimo e 0,5 g de músculo liofilizado e triturado foram colocados em tubos de ensaio e, depois de bem homogenizados, foram deixados em repouso durante 10 minutos, à temperatura ambiente; a seguir, todos os tubos foram incubados por 15 minutos às temperaturas de 20, 40, 50, 60, 70, 80 e 90ºC, respectivamente. Ao mesmo tempo, um "contrôle" contendo 10 ml de água destilada e 0,5 g de músculo triturado foi preparado para cada temperatura. Decorridos os 15 minutos de incubação nas respectivas temperaturas, 2 ml de solução a 10% de ácido tricloroacético foram adicionados a cada tubo, com agitação, a fim de sustar a hidrólise enzímica. Removeram-se, em seguida, por filtração, as proteínas não hidrolisadas. Porções de 1 ml dos filtrados foram transferidos para balões volumétricos de 100 ml, adicionando-os com 3 ml de hidróxido de sódio 0,5 N e 1 ml do reagente Folin - -Ciocalteau. Decorridos 10 minutos de reação, adicionou-se água destilada, agitando sempre, até completar o volume. Em seguida, mediu-se a densidade óptica a 660 mμ, em espectrofotômetro Beckman-DB, ajustando-se o "zero" com água destilada. A densidade óptica representa a concentração de aminoácidos totais que foi obtida pela hidrólise.

Para estudos histológicos, 10 ml de solução a 0,1% de cada ênzimo foram colocados em tubos de ensaio; a cada um foram adicionados pequenos fragmentos de tecido muscular, prèviamente liofilizados e deixados em repouso durante 5 horas à temperatura ambiente (cêrca de 25ºC). Uma solução "contrôle" foi preparada, adicionando-se 10 ml de água destilada ao fragmento de te-

cido muscular. Os pequenos fragmentos liofilizados de tecido muscular absorveram rápidamente a solução enzímica, com uma distribuição bastante homogênea do ênzimo no fragmento muscular. Decorridas 5 horas, os fragmentos foram fixados com formalina a 10%. Após a fixação dos tecidos, foram preparadas "lâminas histológicas" por meio da técnica comum, utilizando-se, como corante, a hematoxilina-eosina.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todos os resultados obtidos sôbre hidrólise enzímica proteolítica de tecido muscular liofilizado, estão representados na Figura 1. Nota-se a inexistência de aminoácidos livres no contrôle, em tôdas as temperaturas, o que parece indicar a inexistência de atividade enzímica nesses controles. A hidrólise da proteína muscular pela tripsina aumentou com a elevação da temperatura, até esta atingir 70°C, quando, então, diminuiu com a elevação da temperatura até 90°C. A hidrólise máxima da proteína muscular pela tripsina foi observada a 70°C. O grau de hidrólise da proteína muscular pela tripsina foi baixo, quando comparado com o obtido com os quatro ênzimos proteolíticos. O mesmo aconteceu com a protéase bacteriana, cuja hidrólise também cresceu com o aumento de temperatura até 70°C, passando, em seguida, a diminuir com o aumento da temperatura. O pico máximo foi encontrado entre 60 e 70°C.

Resultados análogos foram encontrados para papaína e bromelina: o pico máximo da papaína foi alcançado a 70°C e o da bromelina a 60°C. Esta última apresenta baixa resistência à temperatura, em comparação com os demais ênzimos. A hidrólise muscular pela ficina foi visìvelmente mais acentuada que a obtida com os outros ênzimos; a atividade máxima foi observada entre 60 e 80°C, diminuindo ligeiramente até 90°C. Dessa maneira, a ficina apresenta grande resistência à temperatura. Tais ênzimos termorresistentes são de particular importância para o amolecimento de carnes.

A seguinte experiência foi executada: sôbre dois pedaços de carne, espalhou-se uma certa quantidade de papaína, diluída em sais; os bifes foram então perfurados com garfo, um dêles tendo sido posto a cozinhar imediatamente, enquanto o outro foi cozido depois de ficar em repouso por uma hora, à temperatura ambiente.

O grau de amolecimento dos dois bifes cozidos foi comparado, não tendo sido praticamente constatada nenhuma diferença. Isso parece mostrar que o mecanismo do amolecimento da carne ocorre durante o cozimento.

Em ordem crescente da atividade hidrolítica sôbre a proteína muscular, os ênzimos estudados guardam a seguinte posição: tripsina, protéase bacteriana, bromelina, papaína e ficina.

O Quadro 1 e a Figura 1 mostram que não existe correlação entre o grau de hidrólise da caseína e o grau de hidrólise das proteínas dos tecidos musculares.

Quadro 1. Atividade proteolítica de ênzimo sôbre caseína.

ÊNZIMO ENSAIADO	ATIVIDADE DO ÊNZIMO (*)
Protéase bacteriana	200
Ficina	200
Bromelina	230
Tripsina	240
Papaína	400

(*) Medida em Unidades Northrop por grama.

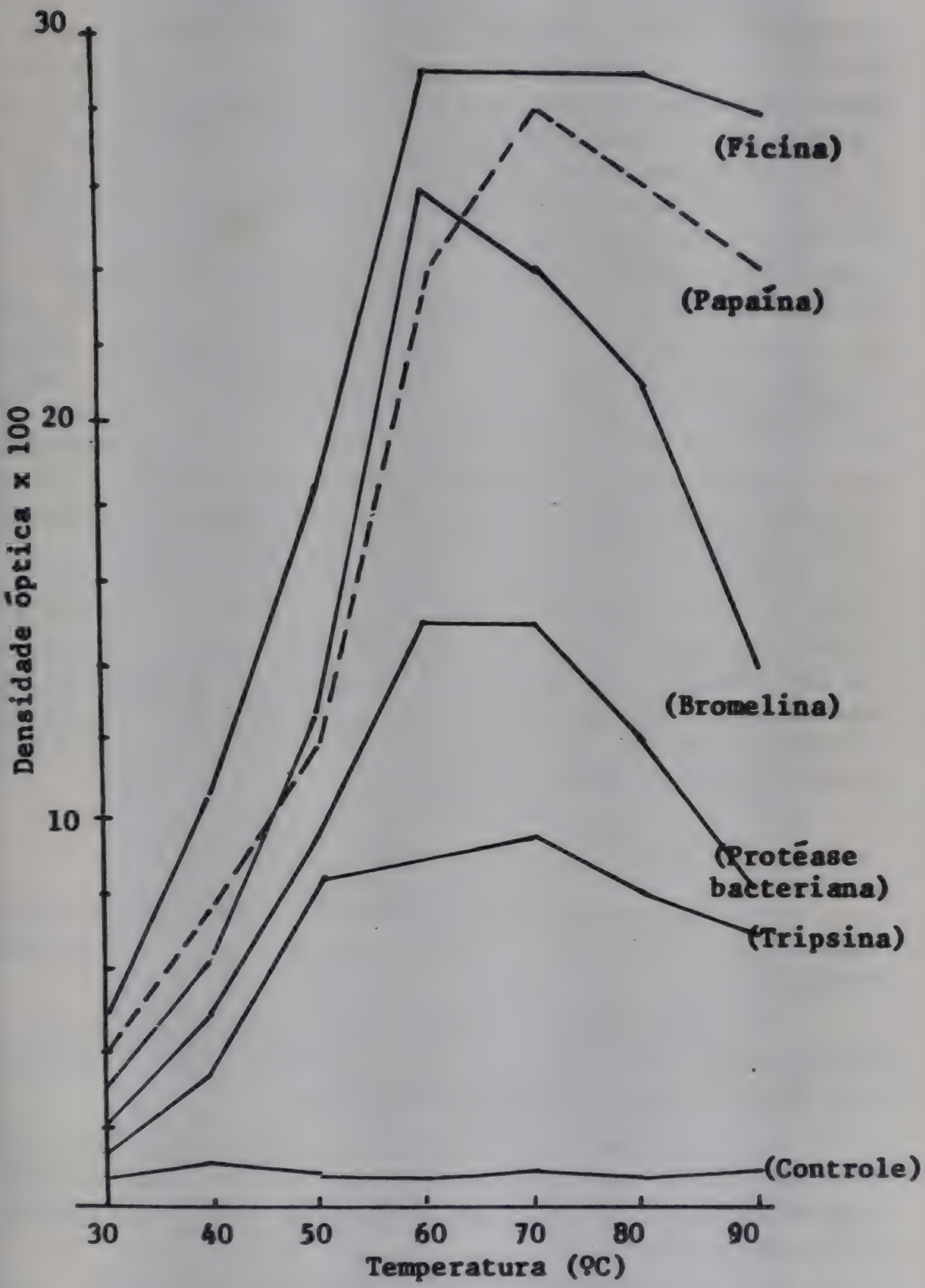


Figura 1. Hidrólise das proteínas de tecido muscular liofilizado por vários ênzimos proteolíticos.

Aspectos histológicos da hidrólise do tecido muscular pelos ênzimos podem ser observados nas figuras 2 e 3. O sarcolema (que é o invólucro da fibra muscular) foi atacado em primeiro lugar; a fibra muscular se desintegrou e, finalmente, o núcleo da fibra muscular desapareceu. O endomísio (que é uma parte do tecido conectivo) foi também hidrolisado. O efeito da hidrólise parcial da proteína do tecido muscular pela preparação enzímica pode ser apreciada na figura 1. Na Figura 2, a microfotografia F mostra como a tripsina atacou fracamente as fibras musculares. Na Figura 3, duas microfotografias, H e I, mostram cortes longitudinais de tecido muscular que foi atacado pela ficina e pela bromelina, em comparação com fibras musculares normais que não foram tratadas com ênzimos. A estriação transversal é visível no músculo-contrôle (fibras musculares normais, microfotografia G). Ao contrário, quando essas fibras foram tratadas com ficina ou bromelina, não aparece a estriação. Êste fenômeno decorre do fato de que o complexo da actomiosina foi atacado pela ação do ênzimo. Como se pode observar nessa microfotografia, o sarcolema e o núcleo muscular também desapareceram e as miofibrilas foram separadas pela ação enzímica.

CONCLUSÕES

1. De um modo geral, ênzimos proteolíticos de vegetais têm alto poder hidrolisante para a proteína muscular.

2. Não há correlação para os ênzimos estudados, entre o grau de hidrólise da caseína e o da hidrólise das proteínas dos tecidos musculares.

3. O grau de hidrólise das proteínas dos tecidos musculares pela ficina é muito alto. Isso se deve, aparentemente, ao fato de a ficina ser relativamente termorresistente.

4. Há correlação entre o grau de hidrólise das proteínas e os resultados observados nos exames histológicos de tecido muscular tratado pelos ênzimos estudados.

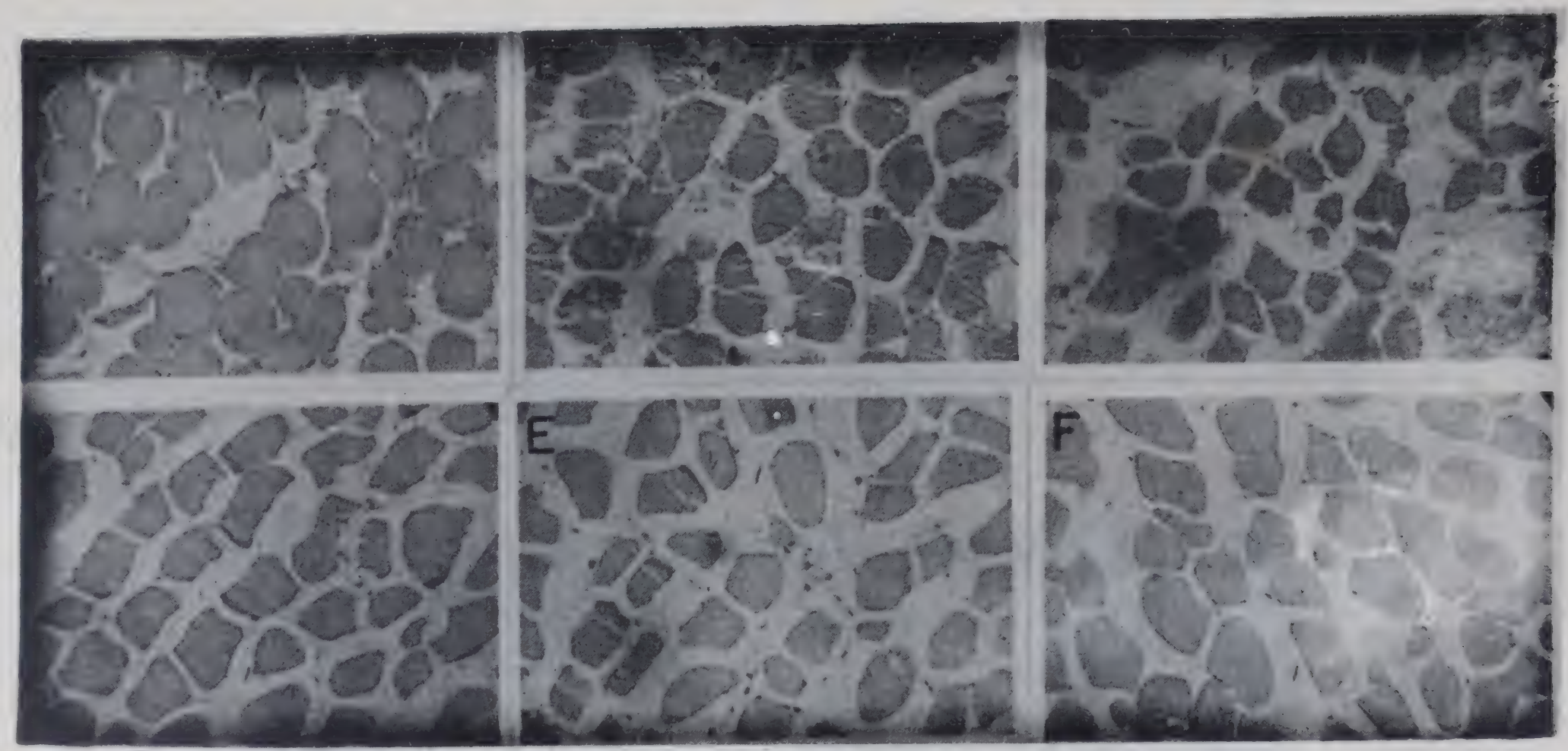


Figura 2. Microfotografias de fibras musculares atacadas por ênzimos proteolíticos.

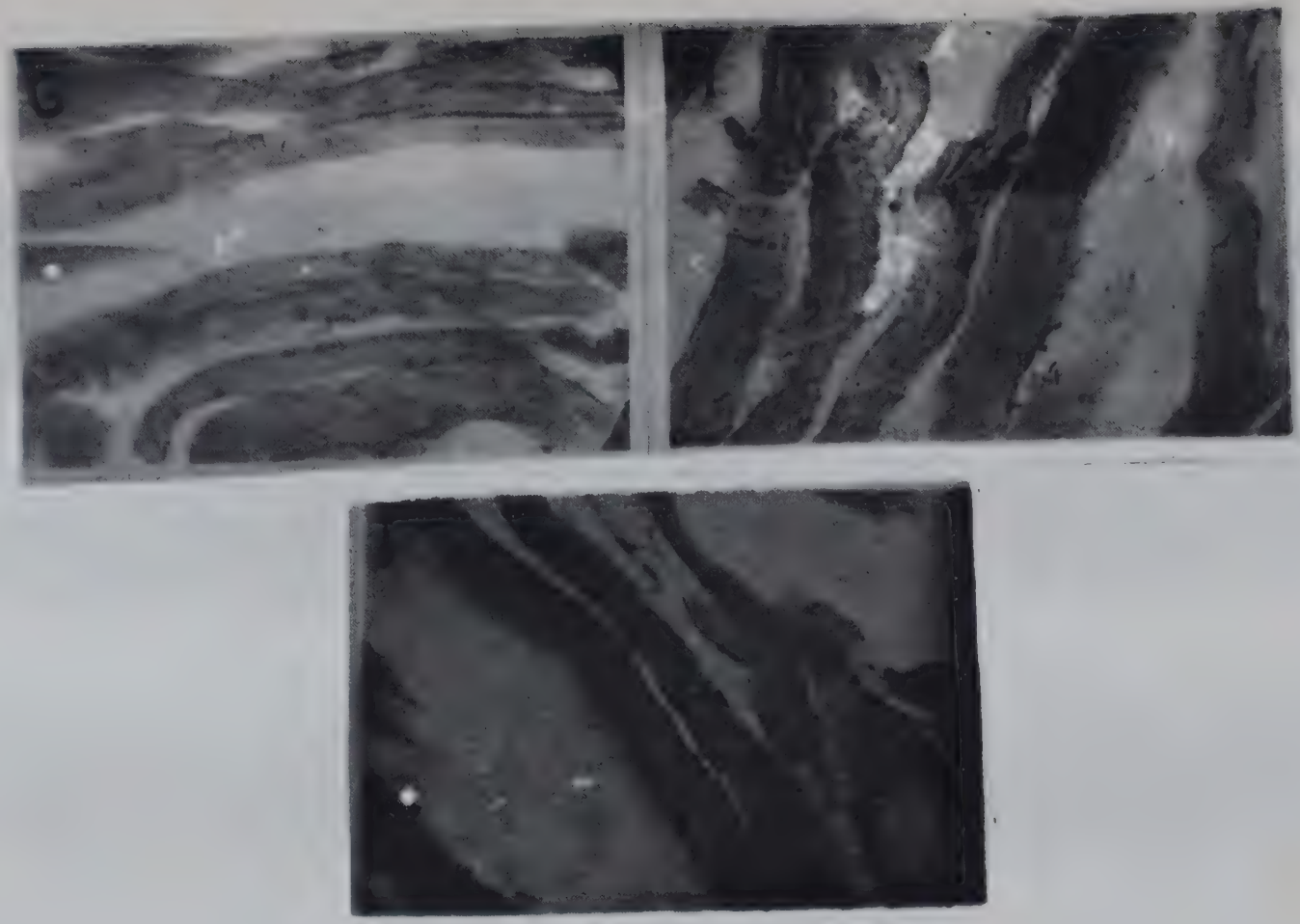


Figura 3. Cortes longitudinais de tecidos musculares atacados por ficina (H) e bromelina (I); G - tecido muscular normal.

LITERATURA

1. BALLS, A. K., THOMPSON, R. R. & JONES, W.W. Crude papain. Ind. Eng. Chem. 32: 1144, 1940.

2. BECKHORN, E.J. Production of Industrial Enzymes. Walerstein Lab. Commun. 23, 201, 1960.

3. EL-GHARBAWI, M. & WHITAKER, J.R. Factors Affecting Enzymatic Solubilization of Beef Proteins. J. Food Science 28: 168, 1963.

4. HEINICKE, R. M., GORTNER, W.A. Stem Bromelin from pineapple plant. Economy Botany 11: 225, 1957.

5. HINRICHS, J.R. & WHITAKER, J.R. Enzymatic degradation of collagen. J. Food Science 27: 250, 1962.

6. KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiology 30: 291, 1947.

7. McINTOSH, E.N. & CARLIN, A.F. The effect of papain preparations on beef skeletal muscle proteins. J. Food Science 28: 283, 1963.

8. MIYADA, D.S. & TAPPEL, A.L. The hydrolysis of beef proteins by various proteolytic enzymes. Food Research 21: 217, 1956.

9. REED, G. In Enzymes in Food Processing. Academic Press, New York, p. 205, 1966.

10. TAPPEL, A.L., MIYADA, D.S. & MAIER, V.P. Meat Tenderization. II. Factors affecting the tenderization of beef by papain. Food Research 21: 375, 1956.

11. Technical Information, Assay nº IC-313. Protease Assay. Miles Laboratories. Alkhart, Indiana, U.S.A.

12. WANG, H., WEIR, C.E., BIRKNER, M.L. & GINGER, B. Studies on enzymatic tenderization of meat. II. Panel and Histological Analyses of Meat Treated with liquid tenderizer containing papain. Food Research 23: 423, 1958.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/70

MÉTODOS DE HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS EM ALIMENTOS PARA DETERMINAÇÂO DE AMINOÁCIDOS

Iovaldo B. Figueiredo

RESUMO

A finalidade dêste trabalho consistiu em apresentar um método de hidrólise e preparo final de amostras protéicas.

Para efetuar a hidrólise, utilizou-se de uma ampola especial de vidro, na qual foi pesada a amostra, adicionando-se, a seguir, ácido clorídrico 6 N. Fechou-se em bico de Bunsen, a vácuo ou em atmosfera de nitrogênio, a fim de evitar a presença de ar na ampola. Colocou-se a 110ºC durante 22, 48 ou 72 horas, hidrolisando-se, assim, os péptides que iriam interferir na análise. Após essa operação, evaporou-se o ácido clorídrico à temperatura ambiente. Para isso, o hidrolisado foi lavado com álcool a 70ºC e transferido para uma placa de Petri. Juntaram-se 5 ml de solução tampão de pH 2,2 ao resíduo e filtrou-se. Isso feito, o hidrolisado ficou pronto para ser analisado por cromatografia líquida de troca iônica.

Nesse processo, são utilizadas duas colunas: a primeira de 56 cm de comprimento, por 0,9 cm de diâmetro, com resinas A.A.15 de Beckman, para aminoácidos de reação ácida ou neutra; a segunda, de 7 cm de comprimento, por 0,9 de diâmetro, com resina P.A. 35 de Beckman, para aminoácidos de reação básica. Com exceção do triptofânio, que é destruído pela hidrólise ácida, os demais aminoácidos são determinados, qualitativa e quantitativamente, numa amostra protéica.

A determinação do triptofânio é baseada na hidrólise alcalina, empregando-se uma base fraca, geralmente o hidróxido de bário, autoclavando-se durante 7 horas a 110ºC. Por reação colorimétrica com dimetilaminobenzaldeído, o triptofânio é determinado quantitativamente na amostra.

SUMMARY

METHODS OF HYCROLYSIS OF PROTEIN IN FOODS FOR AMINO ACIDS DETERMINATION. The purpose of this study was to confirm a method of hydrolysis and final preparation of samples for amino acid analysis.

The hydrolysis was performed in special ampules in which the samples were accurataly wighted following addition of hidrochloric acid 6 N.

The ampules were either evacuated or buble with nitrogen to displace the air, and immediatly sealed with flame (Bunsen burner).

The sealed ampules were inoculated at 110ºC for 22, 48, or 72 hours. At the end of incubation period, the ampules and content were cooled to room temperature and the HCl evaporated at the same temperature. For this purpose the hydrolysate was transfered to a Petri dish washing the ampules with ethyl alcohol 70ºG.L.

To the residue 5 ml of buffer pH 2.2 was added and filtered. The filtrate (hydrolysate) sas ready for analysis in the ion exchange column (Amino acid Autoanalyser).

Two columns were used for the analysis: one of 56 x 0,9 cm for de acidic and neutral amino acids, made of AA 15 Beckman resin, the other 7 x 0,9 cm for the basic amino acids made of PA 35 Beckman resin.

All the protein amino acids are determined qualitatively and quantitatively by this process, except triptophan which is completely destroyed by hydrolysis with acid.

The tryptophan determination is made after hydrolysis with a weak base (barium hydroxide) auto - claving for 7 hours at 100ºC. The amount of triptophan in the sample is determined colorimetrically based on the reaction with p-dimethylbenzaldeyde.

INTRODUÇÃO

O presente trabalho consiste na apresentação de um método de hidrólise e de preparo final de amostras protéicas, destinadas à determinação de aminoácidos, para a qual ainda há muito pouca referência na literatura especializada.

O cromatógrafo por troca iônica vem sendo utilizado, desde 1958, na determinação quantitativa dos aminoácidos.

Êsse processo analítico também permite ampla aplicação no campo da fisiologia, por meio da dosagem de aminoácidos livres em exsudatos, urina e sangue. Atende, portanto, a um estudo completo do metabolismo animal. É utilizado, ademais, no campo da nutrição, com a finalidade de verificar a carência de aminoácidos em rações animais.

No preparo da amostra a ser analisada, o autor empregou ampola especial de vidro (ver preparo da amostra), na qual aquela foi hidrolisada por tempo indeterminado e à temperatura de 110ºC. Por êsse método, todos os aminoácidos componentes da proteína, com exceção do triptofânio, foram determinados quantitativamente, por cromatografia de troca iônica. Nas determinações, o sistema todo é parte integrante do processo analítico, como: eluentes de diferentes pH, solução

de ninidrina, banho de reações, sistema de circulação de água, fotocolorímetro, bombas de fluxo e registrador.

Noções gerais de proteína

Proteínas são combinações de moléculas de aminoácidos com agrupamentos carboxílicos e amínicos, aos quais se ligam ao longo de cadeia CO-NH, formando os di, tri e polipéptides. Se existir na sua estrutura predominância de agrupamentos carboxílicos, têm-se os aminoácidos ácidos; ao contrário, se houver predominância de agrupamentos amínicos, têm-se os aminoácidos básicos; e, com ambos os agrupamentos em equilíbrio, os aminoácidos neutros.

EMIL FISCHER e FRANZ HOFMEISTER, em 1902, aventaram a hipótese de que, nas proteínas, os grupos alfa-amínico e alfa-carboxílico, dos diferentes aminoácidos estão ligados, formando um anel amida, sendo um péptide o produto de tais condensações de reação. Quando o anel amida se liga a dois aminoácidos, forma-se uma cadeia peptídica ou anel péptide.

Quando se hidrolisa um péptide por ácidos ou bases, há ruptura da cadeia peptídica e liberação dos aminoácidos, os quais são analisados sob a forma livre. Com a introdução da técnica cromatográfica no estudo da química das proteínas, muitas cadeias peptídicas foram identificadas por intermédio de hidrólises parciais, cujos componentes podem ser revelados pela cromatografia.

Se houver a necessidade de analisar aminoácidos livres, o que é comum em metabolismo animal (nos fluidos e extratos fisiológicos), e se a proteína estiver presente, esta deve ser prèviamente removida, pois, caso contrário, ela se ligará, irreversìvelmente, às resinas. Neste caso, procede-se primeiro à desproteinização da amostra com solução de ácido pícrico a 1%, eliminando-se o excesso em coluna de Dowex 2x10.

Aplica-se o método sòmente em casos patológicos, nos exames de urina, plasma, extratos de tecido e líquidos encefalorraqueanos.

Consideração sôbre as resinas

Um electrólito sempre se dissocia em igual número de iontes. É o que se denomina de electroneutralidade, por não apresentar excesso de carga. Geralmente são ácidos, bases e sais, enquanto que os electrólitos sintéticos, são chamados de trocadores de iontes.

Se soluções electrolíticas são adicionadas ao sistema trocador de iontes e se fôr feita a separação, encontram-se iontes da solução electrolítica na resina, e vice-versa, tornando-se igual o número de cargas iônicas. Êsse equilíbrio de troca de iontes pode ser expresso em têrmos de coeficiente seletivo, o qual é determinado pela seguinte equação de equilíbrio:

$$K_s = \left(\frac{R}{E}\right)_o \left(\frac{E}{R}\right),$$

em que K_s é o coeficiente seletivo e $\left(\frac{R}{E}\right)_o$ e $\left(\frac{E}{R}\right)_i$, referem-se à porcentagem de concentração de iontes R e E na fase tampão (o) e fase resina (i), respectivamente. Êsse coeficiente depende de vários fatôres, tais como: natureza dos trocadores de iontes, grau de saturação dos trocadores (tampões) e temperatura.

Dois tipos de resinas poliméricas trocadores de iontes são considerados: os de cationtes, dos quais fazem parte as resinas polissulfônicas, que são a Dowex 50, Amberlite IR 100 e aquelas utilizadas nas análises de aminoácidos, P.A. 28 A.A. - 15 e P.A.35 (Beckman); e as de aniontes, entre os quais estão as resinas poliamínicas, como a Dowex 2 e Amberlite IR 410. Êsses trocadores de iontes podem ser divididos em dois grupos: aquêles em que a cadeia polímera é ordenada e rígida; e aquêles em que esta é intumescida

e não orientada. Fazem parte dêsse último grupo, as resinas trocadoras de iontes utilizadas na análise de aminoácidos.

A resina empregada no presente trabalho foi aquela resultante da sulfonação de um copolímero estirenodivinilbenzeno, misturado a um peróxido, no qual se goteja água sob agitação e se aquece até polimerização total, em presença de ácido clorossulfônico ou sulfúrico, neutralizando-se o excesso de ácido por hidróxido de sódio.

Os grânulos de polímero são separados em tamanhos de 19 a 31 mícrons, conforme as necessidades do trabalho.

PREPARO DA AMOSTRA

O analisador de aminoácidos foi propositadamente construído para que se pudesse obter, com precisão, a concentração de aminoácidos livres (individuais) numa amostra protéica. O pêso da amostra a ser analisada é calculada levando-se em conta a proporção de aminoácido ou de proteínas presentes. Quando os aminoácidos são conhecidos, como no caso da padronização do aparelho, êles são pesados na proporção de 0,1 a 5,0 micromoles para cada um. Quanto às proteínas, pesa-se uma quantidade equivalente a 3,5mg de proteína total.

Técnica de hidrólise

Na impossibilidade de dispor-se de uma ampola especial, pode-se substituí-la por um tubo capilar com uma pequena abertura de 1 a 3 cm na parte superior (pescoço). As paredes do tubo improvisado não devem ser muito finas, a fim de que possam suportar o vácuo e as temperaturas da hidrólise.

No caso da ampola especial, esta deve ter um comprimento de mais ou menos 20 cm e ser fechada na parte superior, a fim de evitarem-se contaminações nas amostras.

Para pesagem da amostra, quebra-se, primeiramente, o vidro que fecha ou protege a ampola, removendo-se, a seguir, com um bastão, todos os estilhaços. Introduz-se, a seguir, a amostra na ampola, evitando-se que esta tenha qualquer contacto com as paredes. O pêso da amostra deve corresponder a 3,5 mg de proteína total. Adicionam-se cêrca de 2 ml de ácido clorídrico 6N; se a amostra fôr líquida, tomam-se proporções iguais de ambos.

Após a mistura da amostra, mergulha-se a ampola em banho de álcool e gêlo, e liga-se a extremidade superior da ampola a uma bomba de vácuo de até 50 mícrons de pressão de Hg. Deve-se ter o cuidado de colocar um frasco de água, na linha de vácuo, a fim de evitar que gases corrosivos possam passar para a respectiva bomba. Retira-se a ampola do banho ou, se possível, enquanto mergulhada na solução resfriadora, sela-se o pescoço ou a parte afilada em chama (bico de Bunsen), tendo o cuidado de manter o vácuo.

Na impossibilidade de operar-se o vácuo, pode-se eliminar o ar pela passagem ou circulação de nitrogênio por tôda a superfície da amostra, fechando-se, a seguir, a ampola ou o tubo.

Coloca-se o tubo em estufa a 110ºC durante um tempo variável de 22, 40 ou 72 horas. A eficiência de hidrólise sòmente pode ser verificada após efetuar a cromatografia por troca iônica. Quando se analisa a amostra, determina-se a presença de péptides, o que também pode ser obtido por cromatografia. No caso de existência de péptides, o tempo da hidrólise é prolongado, para 40 ou 72 horas, até a destruição total da cadeia peptídica. Retira-se, em seguida, o tubo da estufa, conservando-o em posição vertical até seu esfriamento, de maneira que todo o material permaneça no

fundo da ampola. Remove-se o tôpo desta, riscando-se o vidro com uma lima triangular e batendo-se os bordos com um bastão. Passa-se o hidrolisado para uma placa de Petri de mais ou menos 10 cm de diâmetro, tendo-se o cuidado de lavar a ampola com álcool a 70°C. Evapora-se o solvente, o excesso de ácido clorídrico e a água, a vácuo e à temperatura ambiente, num dessecador, provido de um Beaker contendo hidróxido de sódio e sílica gel. Deve-se evitar que os vapores de ácido cheguem à bomba de vácuo.

Se houver necessidade de rápida evaporação, pode-se utilizar um evaporador rotatório, com fraco aquecimento.

Depois de sêco, o hidrolisado é lavado com 5 ml de tampão citrato de sódio e ácido clorídrico, pH 2,2. Se fôr necessário, centrifuga-se, filtra-se e conserva-se bem fechado, em geladeira a 4°C, até ser empregado (1).

Como êsse processo destrói o triptofânio, principalmente na presença de carboidratos (2), necessita-se de um segundo processo de hidrólise para sua determinação. O triptofânio livre ou em ligações peptídicas desenvolve reações coloridas com diversos reagentes, como p-tolueno-sulfônico, p-dimetilaminobenzaldeído n-bromossuccinimida. Essas reações são básicas na dosagem dêsse aminoácido, que para ser determinado, quantitativamente, necessita de ser comparado com uma curva-padrão, utilizando-se o triptofânio livre. O emprêgo de hidróxido de bário ao invés do de sódio, de acôrdo com o método SPIES e CHAMBERS (3), resulta em mais rápida proporção de hidrólise e sem ocorrer a destruição do triptofânio em presença do aminoácido, como acontece com o hidróxido de sódio. Apresenta, porém, como única desvantagem, uma ligeira racemização.

Método de hidrólise para triptofânio

Pesa-se a amostra com mais ou menos 0,2 g de proteína total, misturada com 15,4 g de hidróxido de bário, triturado e peneirado.

Adicionam-se 9 ml de água e autoclava-se durante 7 horas a 110°C, com pressão de 15 libras/polegada quadrada. Esfria-se e neutraliza-se com ácido clorídrico 6 N (fenolftaleína como indicador). Centrifuga-se e lava-se o precipitado com água e mais ou menos 40 ml de uma solução de sulfato de sódio anidro 175 g/l, completando-se o volume para 200 ml. Centrifuga-se a mais ou menos 2.700 r.p.m., durante 15 minutos, e lava-se o precipitado com 10 ml de água, completando-se o volume para 200 ml. Tomam-se 2 ml e mais 5 ml de p-dimetilaminobenzaldeído a 0,5% (peso/volume) em ácido clorídrico concentrado. Após 20 minutos, adicionam-se 5 ml de solução aquosa a 0,2% de nitrito de sódio. Agita-se, filtra-se em papel Whatman e, após 24 minutos, determina-se a densidade óptica a 590 µm e a cada 40 minutos. Na prova em branco, são adicionados ácidos clorídrico concentrado e 0,2 ml de nitrito de sódio a 0,2%, filtra-se e determina-se a densidade óptica.

Os reagentes necessários para cromatografia

No Quadro 1 estão indicados os reagentes necessários para execução da análise cromatográfica, segundo o pH da solução tampão.

Quadro 1. Composição dos reagentes utilizados para cromatografia.

Soluções tampões pH	Citrato de sódio puro	Ácido clorídrico concentrado	Tiodiglicil	Detergente Bry 25	Pentaciorofenil	Água desmineralizada
pH	g	ml	ml	ml	ml	q.s.p. litro
2,2	19,6	16,5	5,0	2,0	0,1	1
3,28	78,4	49,3	20,0	8,0	0,4	4
4,25	78,4	33,5	20,0	8,0	0,4	4
5,28	137,2	26,0	-	8,0	0,4	4

A preparação da solução de ninidrina obedece à seguinte técnica:

Tomam-se 3 litros de metil-solussolve (etileno-glicol-monometileter) e 1 litro de tampão pH 5,51 com acetato de sódio e ácido acético. Juntam-se 80 g de ninidrina e borbulha-se nitrogênio durante 20 minutos. Dissolvem-se 1,6 g de cloreto de estanho e continua-se a borbulhar o nitrogênio durante mais 15 minutos. Transfere-se, a seguir, o frasco de ninidrina, sempre isento de oxigênio.

Modo operacional

Na recuperação ou regeneração da resina, após qualquer análise, empregam-se hidróxido de sódio 0,2 N e 2% de uma solução de detergente (50 g de Bry 35 em 100 ml), a fim de evitar o crescimento de fungos. Após a recuperação da resina, é necessário restabelecer o seu equilíbrio iônico com tampões de pH 3,28 e 5,28, respectivamente, para resinas de aminoácidos, ácidos e neutros, e básicos, os quais também limpam o excesso de sódio. Três tipos de iontes são envolvidos na interação e eluição dos aminoácidos: SO_3 da resina, ionte do aminoácido e sódio do tampão. Qualquer resíduo da amostra que não fôr eluído com o hidróxido de sódio, permanecerá no tôpo da coluna, podendo ser dali removido com o filtro (disco) de teflon ou, se a pressão de trabalho fôr elevada, removido com cêrca de 1 cm da resina no tôpo da coluna, o qual é substituído por igual porção de resina nova.

Uso das soluções

O tampão de pH 2,2 é empregado na dissolução da amostra hidrolisada; o de pH 3,28, na eluição dos aminoácidos ácidos, enquanto que o de pH 4,25, na eluição dos aminoácidos neutros. Finalmente, o tampão do pH 5,28 é utilizado na eluição dos aminoácidos básicos.

Equilibrada a coluna para aminoácidos básicos, com tampão pH 5,28 e com fluxo de 68 ml/hora e nini-

drina a 35 ml/hora, coloca-se a amostra e procede-se à eluição dos aminoácidos com o tampão acima. Os componentes a serem registrados a partir do tempo de aplicação da amostra, são aquêles indicados no Quadro 2.

Quadro 2. Componentes a serem registrados, segundo o tempo de aplicação da amostra, em minutos.

Aminoácidos	Aminoácido básico	Aminoácido ácido	Aminoácido neutro
	Tampão pH 5,8	Tampão pH 3,28	Tampão pH 4,25
Lisina	30	-	-
Histidina	38	-	-
Amônia	51	-	-
Arginina	65	-	-
Ácido aspártico	-	42	-
Treonina	-	52	-
Serina	-	56	-
Ácido glutâmico	-	63	-
Prolina	-	72	-
Glicina	-	84	-
Alanina	-	92	-
Cistina	-	108	-
Valina	-	117	-
Metionina	-	-	131
Isoleucina	-	-	138
Leucina	-	-	141
Tirosina	-	-	161
Fenilalanina	-	-	167

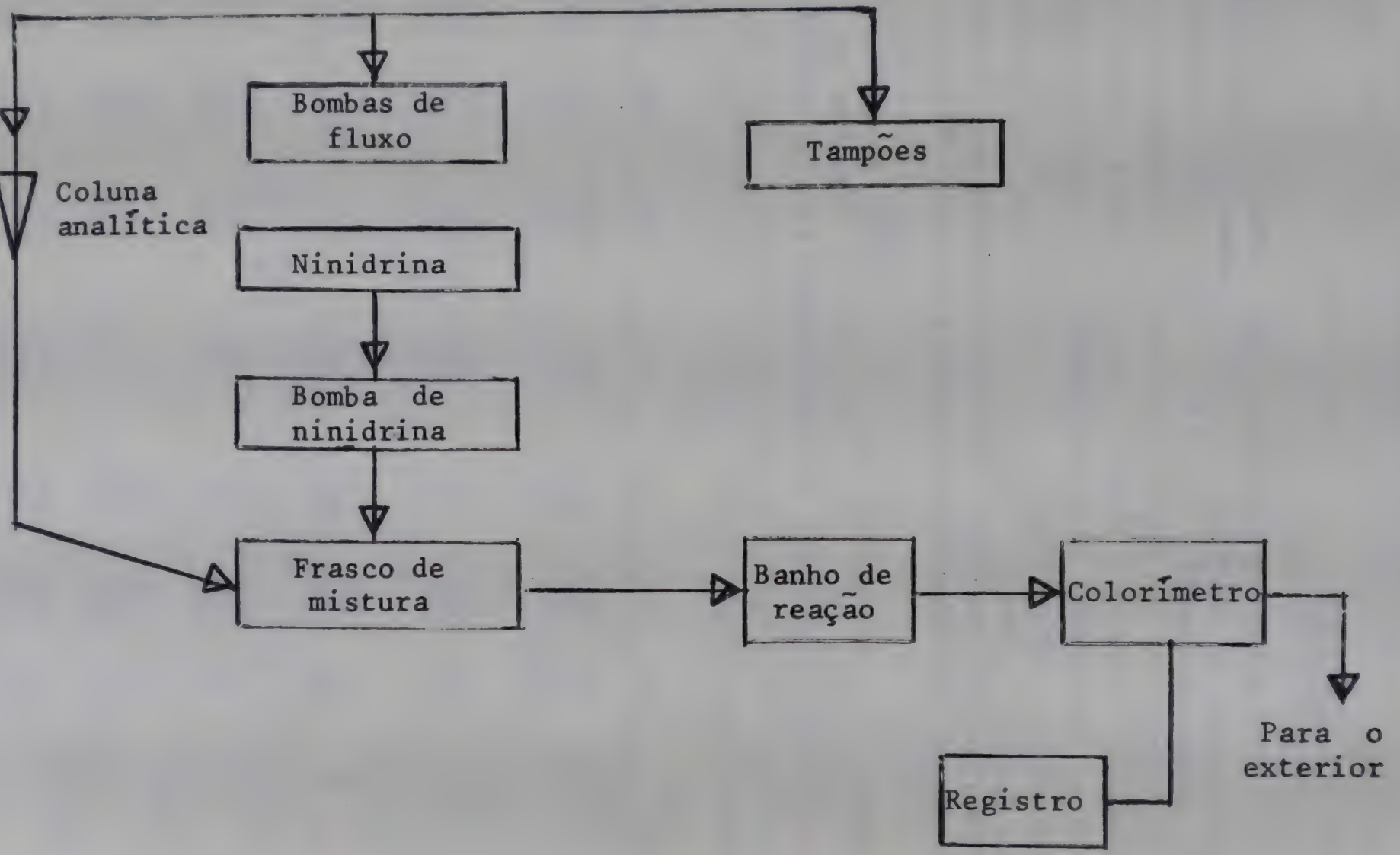
Cálculos

1. De cada componente aminoácido a ser determinado, traçar na curva obtida no cromatograma, uma linha-base horizontal, abrangendo os extremos da curva (início e final desta), e do pico da curva traçar uma linha perpendicular à linha-base, que divide a figura em duas partes iguais.

2. Anotar, para cada curva, a distância que separa sua respectiva linha-base zero, e calcular, em seguida, a altura livre de cada curva, pela subtração dessa distância encontrada da leitura da altura total da curva.

3. Dividir essa altura livre por dois, para encontrar o valor médio, o qual é somado àquela da diferença entre a linha-base da curva e a linha-zero do gráfico, prèviamente determinado, para se obter, então, o valor da altura média de cada curva, tra - çando-se, nesse ponto, uma linha horizontal.

4. Contar o número de pontos registrados de cada curva, que se situam acima dessa linha horizontal. O resultado obtido é multiplicado pela altura livre. Êsse valor é dividido pela constante obtida com o padrão, sendo o resultado expresso em micromols, isto é, multiplicando-se pelo pêso molecular do respectivo aminoácido. Para expressar em micrograma, o valor de micromols é multiplicado pela constante correspondente à relação entre o volume de diluição da amostra e o volume tomado para análise. O resultado obtido é expresso, a seguir, em miligramas. O resultado em miligramas é calculado agora em 100 gramas de amostra, multiplicando-se aquêle pela relação entre o pêso de amostra analisada. O resultado final deve ser multiplicado por um fator de correção, denominado de compensação, que é próprio de cada tipo de analisador.


Bombas de fluxo
Tampões
Coluna analítica
Ninidrina
Bomba de ninidrina
Frasco de mistura
Banho de reação
Colorímetro
Para o exterior
Registro

APLICAÇÃO DO MÉTODO

Conclusão

O método de hidrólise aqui descrito, empregado na dosagem de aminoácidos em seis amostras de semolina de trigo comercial, com três repetições, mostrou-se eficiente com o emprêgo de ácido clorídrico 6 N, durante 22 horas e a 100ºC. Sua eficiência, positivada pelos resultados obtidos (Quadro 1), mostram pequenas variações, especialmente em relação aos aminoácidos essenciais: lisina, leucina, isoleucina, triptofânio, fenilalanina, valina, metionina e treonina. Êsses resultados comparam-se com aquêles da FAO, 1968 (5).

Quadro 3. Resultados das determinações de aminoácidos essenciais em seis amostras de semolina de trigo duro existente no mercado brasileiro, em mg/100 g.

Material	Lisina	Leucina	Isoleucina	Metionina	Fenilalanina	Treonina	Valina	Triptofânio
Padrão - FAO	364	876	426	196	589	382	577	126
Amostra 1								
A	250	780	411	155	528	347	474	127
B	242	836	422	159	525	401	466	129
C	259	919	419	146	536	340	491	128
Amostra 2								
A	234	918	437	164	546	349	424	122
B	235	930	435	169	543	346	430	120
C	231	941	434	162	548	352	426	126
Amostra 3								
A	246	769	333	139	427	285	356	117
B	241	772	419	145	501	297	347	121
C	253	800	422	143	532	305	394	121
Amostra 4								
A	228	1010	417	157	555	353	425	130
B	226	981	418	143	551	355	421	132
C	227	1005	413	163	572	349	417	125
Amostra 5								
A	260	982	456	171	547	381	454	135
B	280	1018	429	147	551	366	439	128
C	271	986	472	179	552	380	446	126
Amostra 6								
A	226	1146	399	164	518	374	472	129
B	221	979	405	160	507	368	437	129
C	239	1204	404	160	517	374	484	132

Quanto ao triptofânio, emprega-se apenas o método de MILLER (2), que consiste na hidrólise por hidróxido de bário e neutralização do ionte bário com ácido clorídrico. Pelo método de ácido sulfúrico ou dióxido de carbono, a literatura mostra que há destruição do referido aminoácido.

LITERATURA

1. FAO - Food and Agricultural Organization of the United Nations. Amino Acids content of foods and biological data on proteins. NU: IDS/68/1, 277 p., 1968.

2. MILLER, E.L. Determination of the tryptophan content of feedingstuffs with particular reference to cereals. Jour. Sci. Food and Agric. 18 (9): 381 - 386, 1967.

3. SIMMONDS, F. Aminoacid analysis of proteins. Chromatographic analysis of protein hidrolysates. *In* General Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc. 2nd ed, p. 113:126, 1960.

4. SPIES, J.R. & CHAMBERS, D.C. Chemical determination of tryptophan in proteins. Analytical Chem. 21 (10): 1249-1266, 1949.

5. SPINCO DIVISION, BECKMAN INSTRUMENTS INC., Stanford Industrial Park, Palo Alto, California, Model 120 C Amino Acid Analyser, A-IM-3, June 1965.

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE NOVOS CLONES DE MANDIOCA

Leda Maria Pupo
Maria Amélia Chaib
Yara Tosello
Ruth S. Garrutti

RESUMO

Avaliações sensoriais foram realizadas para julgamento de novos clones de mandioca destinados à alimentação.

Foram feitas análises de sabor, textura e preferência, tanto com as raízes cruas como cozidas, empregando-se, como testemunha, um cultivar que normalmente é plantado para consumo.

Dos resultados obtidos, foi possível concluir que alguns dos novos clones apresentavam boas qualidades, aproximando-se bastante daquelas do cultivar testemunha.

SUMMARY

SENSORY EVALUATION OF NEW CASSAVA VARIETIES. *Experiments were carried out for evaluating cassava varieties for eating.*

A sensory evaluation of flavor, texture and preference was conducted for the raw and cooked roots, using as control a sample of the variety which is normally grown and eaten in this area.

From the results it was possible to conclude that some of the new varieties had good qualities, approaching close of the control sample.

INTRODUÇÃO

Na introdução agrícola de um nôvo clone de mandioca, como para outros produtos de alimentação, é de significativa importância o conhecimento de suas características sensoriais, das quais dependerão sua aceitação pelo consumidor.

Em trabalhos realizados anteriormente (1), comentou-se que, mesmo nos dias atuais, ainda se utiliza a mandioca de modo empírico, isto é, é aceita para consumo, desde que, quando cozida, seja apetecível, e quando ingerida por animais, não provoque intoxicação.

PEREIRA E PINTO (3), em trabalho realizado com o objetivo de diferenciar mandiocas tóxicas ou bravas de mandiocas doces ou mansas, estabeleceram correlações entre o teor de ácido cianídrico e o gôsto amargo, degustando raízes cruas (3). Ao que tudo indica, a avaliação do gôsto dominante continua sendo feita em amostras cruas, tanto que PEREIRA e outros (1) concluíram que êsse trabalho não tem sido devidamente considerado, motivo pelo qual ainda é escassa a bibliografia a respeito.

Os mesmos autores afirmam, outrossim, que a degustação de amostras cruas não causa dano à saúde dos provadores, desde que elas não sejam ingeridas, podendo cada indivíduo degustar até dez amostras diàriamente (2).

Baseando-se nessas afirmações, o presente trabalho foi conduzido no sentido de se comparar os resultados de degustações de amostras, tanto cruas como cozidas, avaliando-se um número menor de amostras, por dia.

MATERIAL E MÉTODOS

Das nove amostras analisadas sensorialmente, oito eram de clones novos e uma, que serviu de testemunha, de cultivar bastante difundido entre nós.

O material empregado foi o seguinte:

1) 454 (Testemunha), introduzida em 2 de setembro de 1941, de Guaxupé, Minas Gerais.
2) IAC 19-66, descendente da var. Mantiqueira, como planta-mãe.
3) IAC 121-66, ascendência desconhecida.
4) IAC 67-66, descendente da var. Mantiqueira, como planta-mãe.
5) IAC 113-66, descendente da 59, var. Branca de Santa Catarina, como planta-mãe.
6) IAC 96-66, descendente da 797, como planta-mãe.
7) IAC 45-66, descendente da var. Mantiqueira, como planta-mãe.
8) IAC 80-66, cruzamento 797 - 53 x 797 (retrocruzamento).
9) IAC 115-66, descendente da 59, como planta-mãe.

As avaliações das características sensoriais foram feitas tanto na mandioca crua como na cozida. As amostras de mandioca crua, depois de descascadas, foram raladas e, com êsse material, foi feita a avaliação de sabor, segundo uma escala de 1 a 10 e a indicação do gôsto dominante em cada uma (Ficha 1). As amostras de mandioca cozida tiveram sua qualidade avaliada por escalas de 1 a 10 para sabor, textura e preferência, além de ser solicitada a indicação do gôsto dominante (Ficha 2).

FICHA 1.

	Nº de amostras
Escala de sabor	
10 Muito bom — 9-8-7 Bom — 6-5 Ligeiramente bom — 4-3-2 Ruim — 1 Muito ruim	
Gôsto dominante: doce, salgado, ácido, amargo.	

FICHA 2.

	10	9-8-7	6-5	4-3-2	1	Nº de amostras
Sabor	Muito bom	Bom	Ligeiramente bom	Ruim	Muito ruim	
Indique o gôsto dominante de cada amostra: doce, salgado, ácido, amargo.						
Textura	10 Muito macia	9-8-7 Macia	6-5 Ligeiramente macia	4-3-2 Grosseira	1 Muito grosseira	
Preferência	Gostei muito	Gostei	Gostei Ligeiramente	Desgostei	Desgostei muito	

A análise sensorial foi feita ainda segundo um delineamento estatístico em ' lattice" balanceado 3 x 3, com as seguintes características: t= 9; k =3; r =4 ; b =12; λ =1 .

RESULTADOS

Os dados obtidos para as várias características foram analisados estatìsticamente e os resultados estão indicados, em ordem decrescente, no Quadro 1.

Quadro 1. Resultados médios obtidos para as amostras de mandioca crua em relação ao sabor e para mandioca cozida, em relação ao sabor, à textura e à preferência.

Mandioca crua	Mandioca cozida		
Sabor	Sabor	Textura	Preferência
3) 7,04	1) 6,74	2) 6,97	1) 6,41
1) 6,98	3) 6,41	1) 6,38	4) 5,80
4) 6,21	4) 6,32	4) 5,46	2) 6,73
8) 5,68	8) 6,29	8) 4,90	3) 5,69
6) 5,44	2) 6,08	5) 4,73	8) 5,63
2) 5,42	5) 5,88	9) 4,65	5) 4,87
5) 4,93	6) 4,71	3) 4,35	6) 4,15
7) 4,09	7) 4,42	7) 3,99	7) 4,04
9) 3,08	9) 3,42	6) 3,83	9) 3,09

A avaliação de sabor nas amostras de mandioca crua, demonstrou que as melhores foram a 3 (IAC 121-66) e a 1 (454-Testemunha). Estas não diferiram significativamente entre si, com médias alcançando o nível de sabor bom , da escala de avaliação pré-estabelecida. O gôsto dominante em ambas foi o doce. As amostras 4 (IAC 67-66), 8 (IAC 80-66), 6 (IAC 96-66), 2 (IAC 19-66) e 5 (IAC 113-66) alcançaram médias correspondentes a sabor "ligeiramente bom". O gôsto do-

minante nas amostras 4, 6 e 2 foi o doce, mas na amostra 8, o salgado, e na amostra 5, o amargo. As amostras 7 (IAC 45-66) e 9 (IAC 115-66), piores em sabor, alcançaram médias correspondentes a sabor "ruim". Em ambas, foi o amargo o gôsto dominante.

A classificação de sabor, aplicada para avaliação das amostras de mandioca cozida, demonstrou que a melhor delas foi a 1 (454 - Testemunha), com média correspondendo a sabor "bom". Não houve diferença significativa em sabor entre a amostra 1 e as amostras 3 (IAC 121-66), 4 (IAC 67-66), 8 (IAC 80-66), 2 (IAC 19-66) e 5 (IAC 113-66), que alcançaram médias correspondentes a sabor "ligeiramente bom". O gôsto dominante em tôdas elas foi o doce. As amostras 6 (IAC 96-66), 7 (IAC 45-66) e 9 (IAC 115-66) não diferiram entre si significativamente. No entanto, a amostra 6 alcançou média correspondente a sabor "ligeiramente bom", enquanto que a 7 e a 9 alcançaram médias correspondentes a sabor "ruim". O gôsto dominante na amostra 6 foi o doce, e nas amostras 7 e 9 foi o amargo.

A avaliação de textura das amostras de mandioca cozida, demonstrou que a melhor delas, em relação a esta característica sensorial, foi a 2 (IAC 19-66), com média correspondente à textura "macia". Esta amostra não diferiu significativamente de 1 (454 - Testemunha) e da 4 (IAC 67-66), que alcançaram médias correspondentes à textura "ligeiramente macia". Não houve diferença significativa entre as demais amostras do ensaio, isto é, a 8 (IAC 80-66), 5 (IAC 113-66), 9 (IAC 115-66), 3 (IAC 45-66) e 6 (IAC 96-66), cujas texturas variaram de "ligeiramente macia" a "grosseira".

Em relação à preferência pelas amostras de mandioca cozida, a 1 (454 - Testemunha), 4 (IAC 67-66), 2 (IAC 19-66), 3 (IAC 121-66), 8 (IAC 80-66) e 5 (IAC 113-66) alcançaram valores médios correspondentes a "gostei ligeiramente"; as amostras 6 (IAC 96-66),

7 (IAC 45-66) e 9 (IAC 115-66) alcançaram valores médios correspondentes a "desgostei", da escala de preferência.

CONCLUSÕES

O grau de preferência pelos diferentes clones avaliados no ensaio, indicam que as amostras de melhor qualidade, ou seja, melhor sabor e textura, foram as mais preferidas. Assim é que as amostras 1 (454 - Testemunha), 4 (IAC 67-66), 2 (IAC 19-66), 3 (IAC 121-66), 8 (IAC 80-66) e 5 (IAC 113-66) foram as mais preferidas em ordem decrescente, enquanto que as menos preferidas foram a 6 (IAC 96-66), 7 (IAC 45-66) e 9 (IAC 115-66), também em ordem decrescente. A melhor de tôdas as amostras foi a testemunha, da qual se aproximaram bastante as de números 4, 2, 3, 8 e 5 . A pior de tôdas foi a 9, da qual a 6 e 7 se aproximaram também.

De modo geral, os resultados relativos a sabor das amostras de mandioca crua são concordantes com aquêles obtidos nas amostras de mandioca cozida. É interessante notar que a amostra 8 foi a única a apresentar gôsto dominante salgado, quando crua, tornando-se doce, com o cozimento.

Como era de se esperar, as amostras com gôsto doce dominante, foram consideradas melhores do que aquelas com gôsto amargo dominante.

LITERATURA

1. PEREIRA, A. S., NERY, J. P. & CONAGIN, A. Teor de ácido cianídrico na polpa das raízes dos aipins. Bragantia 19: 247-259, 1960.

2. _____, _____ & IGUE, T. Seleção de novos clones de mandioca para mesa, pela toxicidade

e paladar de suas raízes "in natura". Bragantia 24: LV-LVIII, 1965.

3. PEREIRA, A.S., & PINTO, M.G. Determinação da toxicidade da mandioca pelo paladar das raízes "in natura". Bragantia 21: Nota nº 25,CXLV-CL,1962.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/70

PRODUÇÃO DE XAROPE DE GLICOSE DO AMIDO DE MANDIOCA PELO MÉTODO ÊNZIMO - ÊNZIMO

Yong K. Park
Renato S. Papini

RESUMO

Amiloglicosídase foi produzida de Aspergillus niger *NRRL 3122 e* A. awamori *NRRL 3112, que apresentaram produção elevada de amiloglicosídase e baixa de transglicosídase. Êsses ênzimos foram utilizados para produzir xarope de glicose do amido de mandioca. Foram feitos estudos sôbre o efeito da concentração variada de alfa-amílase termoestável e amiloglicosídase, da temperatura para sacarificação do amido liquefeito e do tempo de permanência para sacarificação.*

Para a produção de xarope de glicose equivalente à alta dextrose do amido de mandioca, foram formuladas as seguintes conclusões:

1. Processo de Liquefação - Misturam-se pastas de amido de mandioca de 30% (p/p) e alfa-amílase bacteriana de 1.500 unidades SKB ou mais por 500 g de amido, aquecendo-se, gradualmente, à razão de 1,5ºC por minuto, ajustando-se o pH a 6,0, com agitação a 85ºC, permite-se liquefazer durante 30 minutos, depois esfria-se a 60ºC, ajustando o pH para 4,0.

2. Processo de Sacarificação - Depois do processo de liquefação, adicionam-se 70 unidades amiloglicosídase (AU) ou mais por 500 g de amido, conservando-se durante 72 horas à temperatura de 60ºC.

SUMMARY

PRODUCTION OF GLUCOSE SYRUP FROM CASSAVA STARCH BY ENZYME-ENZYME METHOD. *Amyloglucosidase was produced from* Aspergillus niger *NRRL 3122 and* A. awamori *NRRL 3112, which produce high amyloglucosidase and law transglucosidase. These enzymes were used to produce glucose syrup from cassava starch. Studies were made on the effect of varying concentration of thermostable alpha-amylase and amyloglucosidase, temperature for saccharification on the liquefied starch, and holding time for saccharification.*

For the production of high dextrose equivalent glucose syrup from cassava starch, the following conclusions were made:

1. Liquefying process - 30% (w/w) cassava starch slurries and bacterial alpha-amylase of 1500 SKB units or more per 500 grams of starch mixed togegher, heating gradually at the rate of 1.5ºC per minute, adjusting pH to 6.0, with stirring at 85ºC, and allow to liquefaction for 30 minutes, then cool to 60ºC, adjusting the pH to 4.0.

2. Saccharifying process - after liquefying process add amyloglucosidase 70 units (AU) or more per 500 grams of starch, holding for the 72 hours at the temperature of 60ºC.

INTRODUÇÃO

A mandioca é uma planta tropical, nativa no Brasil e em outros países sul-americanos, tendo sido, porém, introduzida em muitas regiões tropicais. Pertence à família das euforbiáceas, sendo designada, botânicamente, pelo nome de *Manihot esculenta* Crantz. Suas raízes contêm de 25 a 30% de amido. Processadas sob a forma de raspa, contêm cêrca de 75% de amido ou fécula.

TEIXEIRA e outros (17) e BANZON e outros (1), apresentam, em seus trabalhos, rendimentos de 20% de álcool etílico em mostos de amido de mandioca, com conversão feita por amílase fúngica, em fermentação submersa.

No presente trabalho, é estudada a utilização do amido de mandioca para produção de xarope de glicose, por meio de ênzimos microbianos.

Sabe-se, há muito tempo, que os ênzimos fúngicos produzem glicose a partir do amido. O conhecimento de amiloglicosídase para êsse fim é recente. KERR e outros (8) foram os primeiros pesquisadores a reconhecer, vagamente, a presença dêsse ênzimo em preparações comerciais de amílase fúngica. CORMAN e outros (3, 4) e POOL e UNDERKOFLER (13), demonstraram a importância da amiloglicosídase na produção de açúcares fermentescíveis do amido. Recentemente, PAZUR e outros (10, 11, 12) descreveram o método de preparação de amiloglicosídase purificada, obtida a partir de amílase fúngica comercial. HOULE e GOERING (6) produziram xarope de glicose de cevada, usando a alfa-amílase bacteriana para a liquefação do amido, seguindo-se sacarificação posterior por meio de várias amílases fúngicas.

A produção de xarope de milho por liquefação do amido por meio de alfa-amílase bacteriana, seguida pela sacarificação até glicose pelo ênzimo fúngico amiloglicosídase, foi introduzida por DENAULT e UNDERKOFLER (5) e CADMUS e outros (2).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a obtenção da amiloglicosídase foram usados os microrganismos *Aspergillus niger* NRRL 3122 e *A. awamori* NRRL 3112. Essas linhagens provaram ser as mais eficientes na conversão total amido-glicose, além

de apresentarem alta atividade enzímica em amiloglicosídase e baixa atividade em transglicosídase. O método para a produção de amiloglicosídase é descrito em detalhes por CADMUS e outros (2) e SMILET e outros (15).

Para obtenção do ênzimo da alfa-amílase bacteriana termoestável, foi usado o microrganismo *Bacillus subtilis* NRRL B-941. O meio de cultura empregado consistiu em 5% de extrato de farinha desengordurada, 3% de amido de mandioca liquefeito por ênzimo, 1% de $(NH_4)HPO_4$, 0,02% de KCl, 0,02% de $MgSO_4 . 7H_2O$ e 1% de álcool etílico. O pH foi ajustado para 7,0. A inoculação dos frascos de Erlenmeyer de 500 ml de capacidade, contendo 100 ml do meio de cultura, foi feita com culturas puras, estoque do referido organismo. Os frascos inoculados foram incubados a 35ºC, em agitador rotativo a 150 r.p.m., durante 48 horas. Decorrido êsse tempo, o material foi centrifugado para a remoção do material insolúvel, ajustando-se o pH do líquido enzímico para 7,0.

A atividade enzímica de 1 ml da solução de alfa-amílase bacteriana foi de 80 unidades SKB. Foi determinada de acôrdo com o método de Sandstedt e outros (14).

A atividade da amiloglicosídase foi determinada pelo método citado no Boletim Técnico dos Laboratórios Miles (9). A atividade de uma unidade de amiloglicosídase (AU) é a quantidade necessária de ênzimos para produzir 1 grama de glicose em uma hora, quando incubado com uma solução de amido solúvel, em temperatura de 60ºC e pH igual a 4,0.

A determinação dos açúcares redutores foi feita pelo método de SOMOGYI (16). O equivalente em dextrose (DE) é determinado pela extensão da sacarificação alcançada, sendo os açúcares redutores expressos em dextrose e calculados em porcentagem da matéria sêca total.

O amido ou fécula de mandioca usado neste trabalho foi o produto comercial obtido na variedade Água Branca.

A amiloglicosídase e a alfa-amílase bacteriana foram usadas sob a forma líquida, ou seja, o líquido original filtrado após a fermentação.

O mosto de amido na proporção de 30% (pêso/pêso) foi misturado com alfa-amílase bacteriana para liquefação a pH 6,0, com aquecimento lento e gradual de 1,5°C por minuto, sob agitação constante e lenta, até alcançar a temperatura de 85°C, que se manteve durante 30 minutos. Em seguida, resfriou-se para 70, 60, 50 e 40°C, respectivamente, ajustando-se o pH 4,0 e sacarificando-se por meio de amiloglicosídase fúngica, nas citadas temperaturas, durante 72 horas. Finalmente, autoclavou-se a 120°C, durante cêrca de 15 minutos, resfriou-se em temperatura ambiente e filtrou-se.

RESULTADOS

Os estudos foram conduzidos para verificar a influência da aplicação de diferentes quantidades de alfa-amílase e de amiloglicosídase, a diferentes temperaturas e tempos de sacarificação, sôbre o amido de mandioca.

A liquefação do mosto de amido a 30%, quando misturado com 1.000, 1.500, 2.000, 2.500 e 3.000 unidades SKB de alfa-amílase bacteriana, por 500 gramas de amido, nas condições descritas, resfriando-se a 60°C e sacarificando-se com 80 unidades (AU) de amiloglicosídase por 500 gramas de amido, deram as conversões de 80,97,98,98 e 98 DE, respectivamente, indicadas no Quadro 1.

Os dados do Quadro 2 mostram o efeito das várias temperaturas de sacarificação com 80 unidades (AU) de amiloglicosídase, após liquefação do amido com 2.000 unidades SKB de alfa-amílase bacteriana, por 500

gramas de amido. Como se pode observar, as temperaturas de sacarificação foram de 40, 50, 60 e 70ºC, tendo-se obtido, após 72 horas, valores de conversão de 86, 90, 98 e 94 DE, respectivamente.

Quadro 1. Efeito de várias concentrações de alfa-amílase bacteriana termoestável, durante a liquefação e subseqüente sacarificação com amiloglicosídase fúngica de 80 unidades (AU), por 500 gramas de amido.

Alfa-amílase bacteriana	Valores
Unidades SKB	DE
1.000	80
1.500	97
2.000	98
2.500	98
3.000	98

Quadro 2. Efeito de várias temperaturas durante a sacarificação pela amiloglicosídase de 80 unidades (AU), por 500 gramas de amido, após liquefação destas por alfa-amílase bacteriana termoestável de 2.000 unidades SKB.

Temperatura	Valores
ºC	DE
40	86
50	90
60	98
70	94

Concentrações em amiloglicosídase de 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 unidades (AU), por 500 gramas de amido, foram usadas para sacarificar o amido previamente liquefeito por 2.000 unidades SKB de alfa-amílase bacteriana. Os resultados obtidos acham-se inseridos no Quadro 3, pela qual se observam os valores de conversão (DE) obtidos de 87, 89, 90, 93, 98, 98 e 98, respectivamente, após fermentação durante 72 horas, em temperatura de 60ºC e em pH 4,0.

Quadro 3. Efeito de várias concentrações de amiloglicosídase, durante a sacarificação a 60ºC, após liquefação do amido por 2.000 unidades SKB de alfa-amílase bacteriana termoestável, por 500 gramas de amido.

Amiloglicosídase	Valores
Unidades (AU)	DE
30	87
40	89
50	90
60	93
70	98
80	98
90	98

Finalmente, foi estudada a influência do tempo de sacarificação do amido liquefeito em temperatura de 60ºC e pH 4,0, com 80 unidades (AU) de amiloglicosídase por 500 gramas de amido. Os resultados obtidos estão indicados no Quadro 4, os quais mostram que para os tempos de sacarificação de 4, 8, 21, 45 e 72 horas, os resultados de conversão foram de 50, 67, 90, 98 e 98 DE, respectivamente.

Quadro 4. Efeito de vários tempos de sacarificação do amido por amiloglicosídase de 80 unidades (AU), por 500 gramas de amido, após sua liquefação por alfa-amílase bacteriana termoestável, de 2.000 unidades SKB.

Tempo de sacarificação	Valores
Horas	DE
4	50
8	67
21	90
48	98
72	98

CONCLUSÕES

1. Para se obter uma conversão satisfatória, são necessárias, no mínimo, 1.500 unidades SKB de alfa-amílase bacteriana por 500 gramas de amido, Quadro 1.

2. Pelo exame dos dados do Quadro 2, conclui-se que, estando a temperatura ótima de atividade da amiloglicosídase situada entre 60 e 70°C, a conversão efetuada a 70°C certamente foi incompleta, devido à gradual inativação enzímica pelo prolongado tempo de incubação a essa temperatura.

3. Conclui-se, pelos dados do Quadro 2, que as atividades em amiloglicosídase acima de 70 unidades (AU) mostraram maior índice de conversão, que é de 98 DE.

LITERATURA

1. BANZON, J., FULMER, E. I. & UNDERKOFLER, L. A. Iowa State Coll. J. Sci., 23: 219, 1949.

2. CADMUS, M.C., JAIKO, L.G., HENSLEY, D.E., GASDORF, H. & SMILEY, K.L. Enzymatic production of glucose syrup from grains and its use in fermentations. Cereal Chem., 43: 658-669, 1966.

3. CORMAN, J. & LANGLYKKE, A.F. Action of mold enzymes in starch saccharification. Cereal Chem. 25: 190-201, 1948.

4. _____ & TSUCHIYA, J.M. Cereal Chem. 28: 280, 1951.

5. DENAUT, L. J. & UNDERKOFLER, L. A. Conversion of starch by microbial enzymes for production of syrups and sugars. Cereal Chem., 40: 618-629, 1963.

6. HOULE, M.J. & GOERING, K. J. Enzymatic conversion of barley carbohydrate into syrup. Food Technology, 15: 25-28, 1961.

7. KERR, R.W., MEISEL, H. & SCHINK, N. Corn sirups of high fermentability. Ind. Eng. Chem. 34: 1232-1234, 1942.

8. _____ & SCHINK, N.F. Fermentability of cornstarch products. Relation to starch structure. Ind. Eng. Chem. 33: 1418-1421, 1941.

9. MILES LABORATORIES. Diazyme Assay Procedure, Technical Bulletin, Assay nº 5-125, revised 8-4-66, 5p.

10. PAZUR, J. H. & ANDO, T. J. The action of an amyloglucosidase of Aspergillus sugar on starch and malto-diposaccharides. Biol. Chem. 234: 1966-1970, 1959.

11. PAZUR, J.H. & ANDO, T. The hydrolysis of glucosyl oligosaccharides with alpha-D (1__4) and alpha -D-(1__6) bonds by fungal amyloglucosidase. Biol. Chem., 235: 297-302, 1960.

12. _____ & KLEPPE, K. The hydrolysis of α-D-glucosides by amyloglucosidase from Aspergillus niger. J. Biol. Chem. 237: 1002-1006, 1962.

13. POOL, E.L. & UNDERKOFFLER, I.A. Amylotic factors of bran culture and submerged culture. J.Agr. Food Chem., 1: 87-90, 1953.

14. SANDSTEDT, R.M., KNENN, E. & BLISH, M.J. A standardized Wohlgenuth procedure for alpha-amylase activity. Cereal Chem., 16: 712-723, 1939.

15. SMILEY, K.L., CADMUS, M.C., HENSLEY, D.E. & LAGODA, A.A. High-Potency amyloglucosidase-producing mold of the Aspergillus niger Group.Appl. Microbiol. 12: 455, 1964.

16. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem. 160: 61-68, 1945.

17. TEIXEIRA, C, ANDREASEN, A.A. & KOLACHOW, P. Ethyl alcohol from cassava. Ind. Eng. Chem. 42: 1781-1783, 1950.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/70

OBSERVAÇÕES SÔBRE A COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DE ALGUMAS VARIEDADES DE CITROS

Iovaldo B. Figueiredo
João Shojiro Tango

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a composição do óleo essencial de algumas variedades de laranja e de limão, cultivadas no Estado de São Paulo, foram efetuadas extrações do óleo da casca das frutas, por meio de arraste por vapor, analisando-se, a seguir, os óleos obtidos por meio de cromatografia a gás.

Observou-se que há um ligeiro aumento na quantidade de óleo essencial da casca com a maturação das frutas. A quantidade média de óleo essencial nas laranjas das variedades Hamlin, Baianinha e Pêra foram de 0,43, 0,62 e 0,79%, respectivamente. Os resultados das análises por cromatografia a gás mostraram a existência de 15 componentes no óleo, sendo o limoneno o principal deles, participando com cêrca de 95%, para a laranja, e 65% para o limão.

SUMMARY

OBSERVATIONS ON THE COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL OF SOME CITRUS VARIETIES. *The essential oil composition of some orange and lemon varieties grown in São Paulo State, was investigated. The oil composition from the skin and the oil contents in the fruits were determined by gas-liquid chromatography.*

The results shows a slight increase of oil with the development of ripening. The average quantity of oil in Hamlin, Baianinha and Pera orange varieties were, 0.43, 0.62 and 0.79% respectively. The G.L C analysis whows 15 components in orange essential oil and 7 components in lemon oils. The main components is limonene, amounting for around 95% in orange oil and 65% in lemon oil.

INTRODUÇÃO

A cultura de citros tem-se expandido nos últimos anos, ocupando, atualmente, posição destacada entre as de maior importância econômica no Estado de São Paulo.

Nos processos convencionais de extração do suco, grande parte do óleo essencial existente na casca é extraído juntamente com êle (1). A separação do óleo existente no suco, antes de iniciar a fase de concentração, é importante, porque o óleo se altera fàcilmente com o calor, dando ao produto um sabor desagradável (3).

A maior parte das plantações de laranja do Estado de São Paulo é formada das variedades Pêra, Hamlin e Baianinha, enquanto que a variedade de limão mais cultivada é a Taiti. As determinações sôbre a variabilidade no teor de óleo essencial da casca, além da composição do óleo, proporcionam dados que servem para avaliar as diferentes variedades de citros (2).

No presente trabalho, são apresentados os resultados sôbre o teor e a composição do óleo da casca das variedades mais cultivadas de laranja e limão no Estado de São Paulo

MATERIAL E MÉTODO

As amostras analisadas provinham da coleção de citros existente na Estação Experimental de Limeira, do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo. Para cada variedade estudada, foram colhidas frutas no estado de côr verde, frutas com casca já colorida e frutas bem maduras, as quais foram classificadas quanto ao grau de maturação, em verdes, semi-maduras e maduras.

Cada amostra era formada de um lote de 20 frutas, as quais foram pesadas e cuidadosamente descascadas para evitar qualquer perda de óleo. Procedeu-se, em seguida, à pesagem das cascas.

Para a determinação da porcentagem de óleo, as cascas depois de imersas em solução saturada de cloreto de sódio foram desintegradas num liquidificador, tomando-se todo cuidado para evitar qualquer perda de óleo. Em seguida, o material foi colocado quantitativamente em um balão e submetido à destilação, por vapor de arraste, até completar a destilação. A porcentagem de óleo foi determinada em relação ao pêso das frutas.

A composição dos óleos foi determinada por meio de cromatografia a gás.

Os óleos de laranja foram analisados em um cromatógrafo de fabricação da Instrumentos Científicos C.G. Ltda. modêlo C.G.-15, provido de detector de condutividade térmica. As condições de trabalho foram as seguintes: colunas de cobre de 3 metros de comprimento com diâmetro interno de 1/4"; fase estacionária, succinato de polietilenoglicol a 15% sôbre Cromossorb W; gás de arraste, hidrogênio, com fluxo de 60 ml por minuto; temperatura programada, de 70 a 140ºC; quantidade de amostra de 2 a 10 microlitros.

Os óleos de limão foram analisados em um cromatógrafo Beckman, modêlo G.C-4, provido de detector de ionização de chama, sob as seguintes condições: coluna de aço inoxidável de 3 metros de comprimento e 1/4" de diâmetro interno; fase estacionária, Carbowax 1.500 a 15% sôbre Cromossorb W; fluxo dos gases; hidrogênio, 6 ml/minuto, e ar comprimido, 250 ml/minuto; temperatura isotérmica a 130ºC; quantidade de amostra, 2 a 10 microlitros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1, encontram-se os dados referentes às porcentagens de óleo e de casca, nas frutas das variedades Hamlin, Baianinha e Pêra, para os três estágios de maturação estudados.

Verifica-se, por êsses dados, que a porcentagem de óleo essencial nas frutas aumentou ligeiramente com o grau de maturação, enquanto que as porcentagens de casca nas variedades Hamlin e Pêra, decresceram ligeiramente com o aumento do grau de maturação das frutas. Nas frutas da variedade Baianinha, a porcentagem de casca aumentou com a maturação. Os teores médios de óleo nas frutas das variedades Hamlin, Baianinha e Pêra foram de 0,43, 0,62 e 0,79%, respectivamente. A variedade Baianinha apresentou, como valor médio, 29,60% de casca, e as variedades Hamlin e Pêra, 26,00 e 25,80% respectivamente.

O Quadro 2 mostra os teores dos componentes determinados no óleo essencial de laranjas maduras das variedades Pêra, Hamlin, Baianinha e Azêda. Não se observou, pràticamente, variação nas quantidades de hidrocarbonetos terpênicos e oxigenados, a não ser uma pequena variação nas porcentagens de mirceno (2,20) no óleo das frutas da variedade Baianinha, e do geraniol (1,12%) no óleo da variedade Hamlin.

Quadro 1. Teores de óleo e de casca, em porcentagem, nas variedades Hamlin, Baianinha e Pêra.

Variedades	Compoentes	Graus de maturação das frutas			Médias
		Verde	Semi-maduro	Maduro	
		%	%	%	%
Hamlin	Óleo	0,40	0,45	0,45	0,43
	Casca	26,60	26,50	24,80	26,00
Baianinha	Óleo	0,54	0,65	0,68	0,62
	Casca	28,40	29,60	30,90	29,60
Pêra	Óleo	0,74	0,81	0,83	0,79
	Casca	26,90	25,50	24,90	25,80

Quadro 2. Composição do óleo essencial de laranja, em porcentagem, das variedades Pêra, Hamlin, Baianinha e Azêda.

Componentes	Variedades			
	Pêra	Hamlin	Baianinha	Azêda
	%	%	%	%
Alfa pineno	0,02	-	-	0,52
Beta pineno	0,23	0,31	0,45	0,86
Mirceno	1,61	1,47	2,20	1,38
Limoneno	95,57	94,56	95,17	96,08
Terpineno	-	-	-	-
Octanal	-	-	-	-
P-cimeno	0,37	0,57	0,61	-
N/identificado	0,06	0,10	-	0,08
"	0,06	0,09	-	0,48
Linalol	0,36	0,52	0,51	0,16
Alfa terpineol	0,03	0,08	-	0,21
Geranial	0,47	0,32	0,41	0,03
Neral	0,08	0,26	0,05	-
Nerol	0,49	0,60	-	-
Geraniol	0,39	1,12	0,58	-

As Figuras 1 e 2 representam, respectivamente, os cromatogramas dos óleos das variedades Hamlin e Pêra. Pode-se observar, nesses cromatogramas, os 15 picos correspondentes a cada componente desses óleos.

No Quadro 3, encontram-se os componentes dos óleos extraídos do limão em estado verde e maduro, da variedade Taiti. Nas condições utilizadas para as análises cromatográficas, foram detectados sete componentes, tanto no óleo do limão verde, como no de limão maduro, como podem ser vistos nas Figuras 3 e 4. As maiores diferenças encontradas foram a maior quantidade de beta-pineno (18,37%) no óleo de limão maduro e um maior teor de limoneno (65,37%) no óleo de limão verde.

Quadro 3. Composição do óleo essencial, em porcentagem, de frutos verdes e maduros de limão da variedade Taiti.

Componentes	Grau de maturação das frutas	
	Verde	Maduro
	%	%
Alfa pineno	3,02	3,24
Canfeno	0,10	0,11
Beta pineno	14,11	18,37
Mirceno	-	-
Limoneno	65,57	61,20
Terpineno	16,25	16,51
Cimeno	0,95	0,57

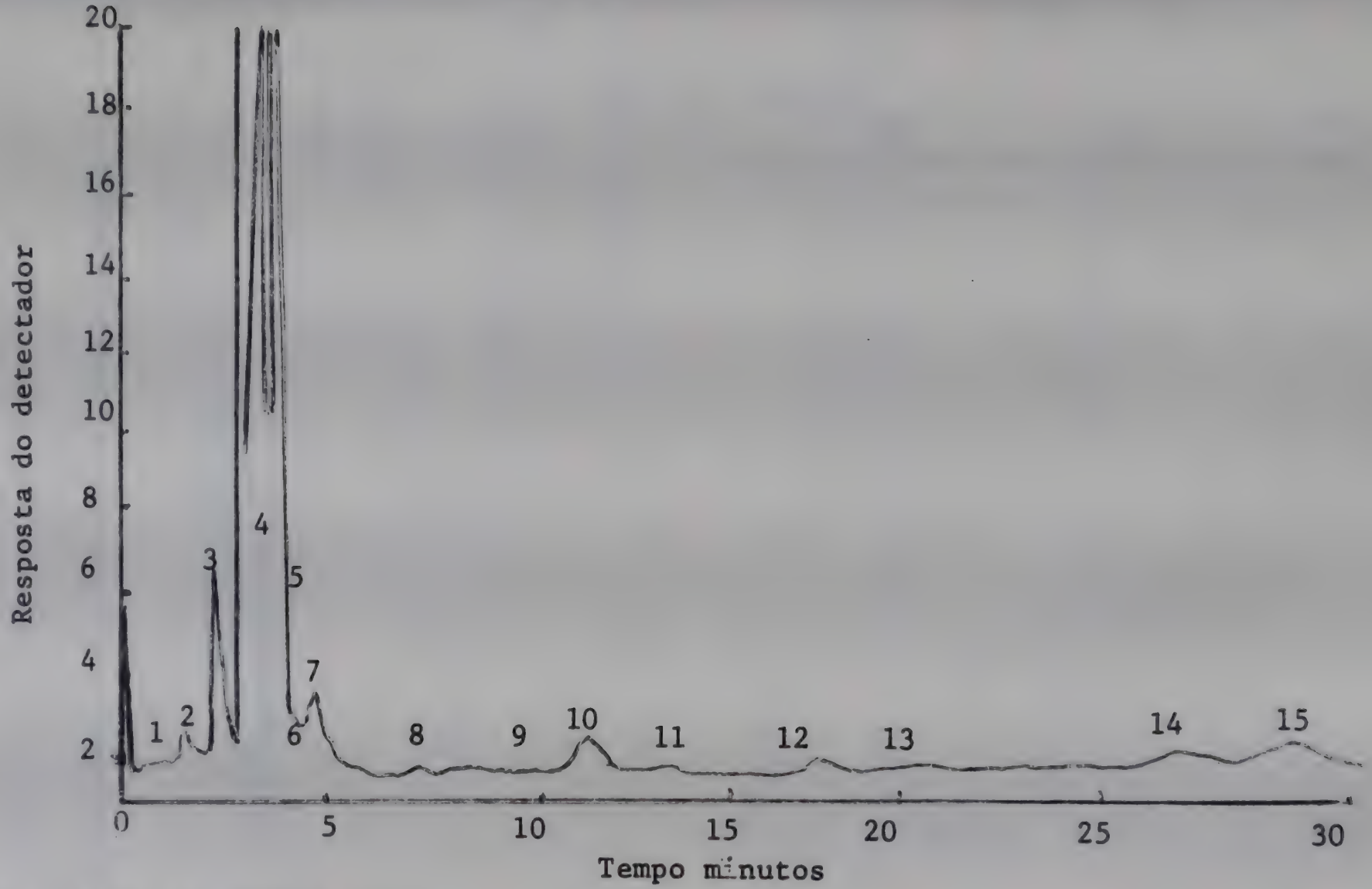


Figura 1. Óleo de laranja Hamlin.

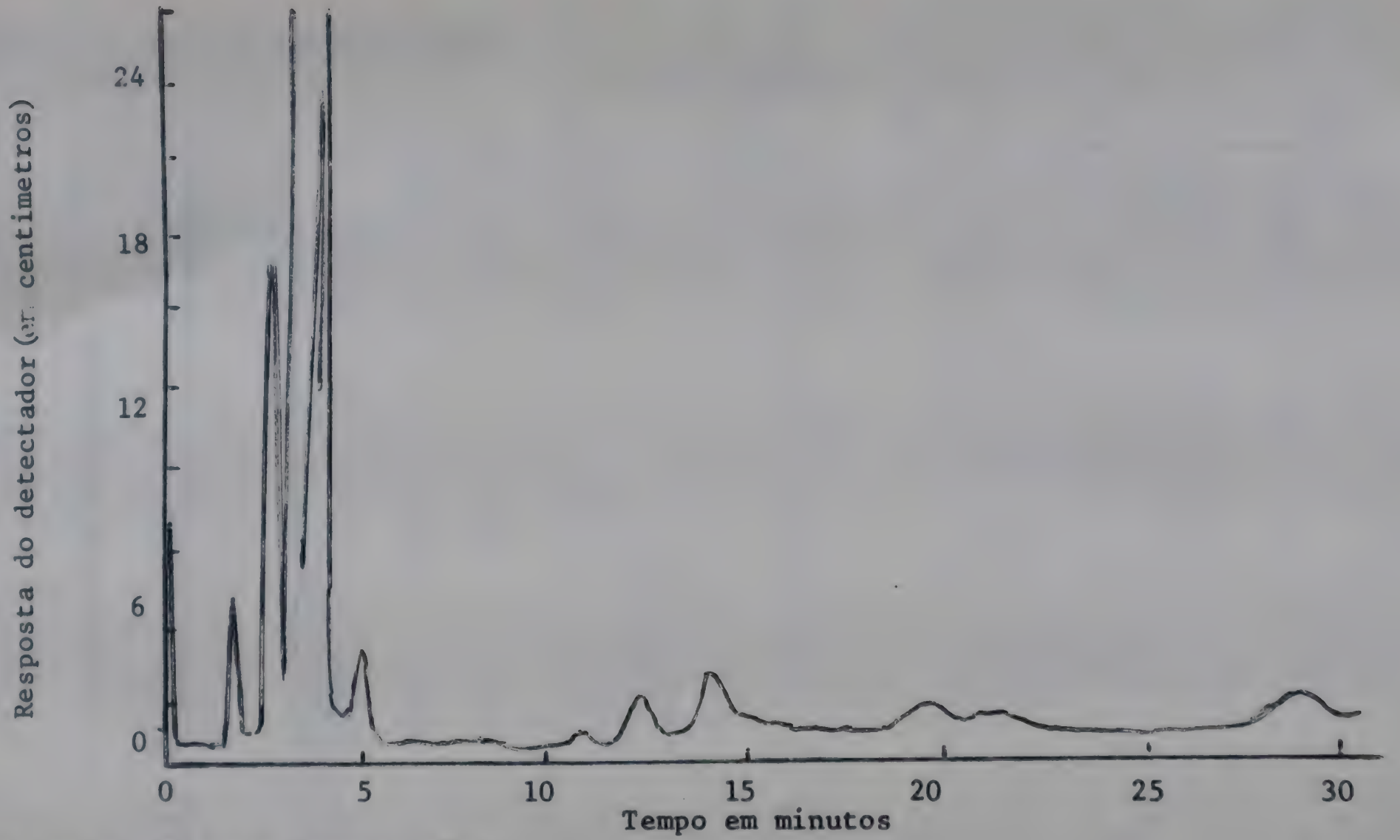


Figura 2. Óleo de laranja Pêra.

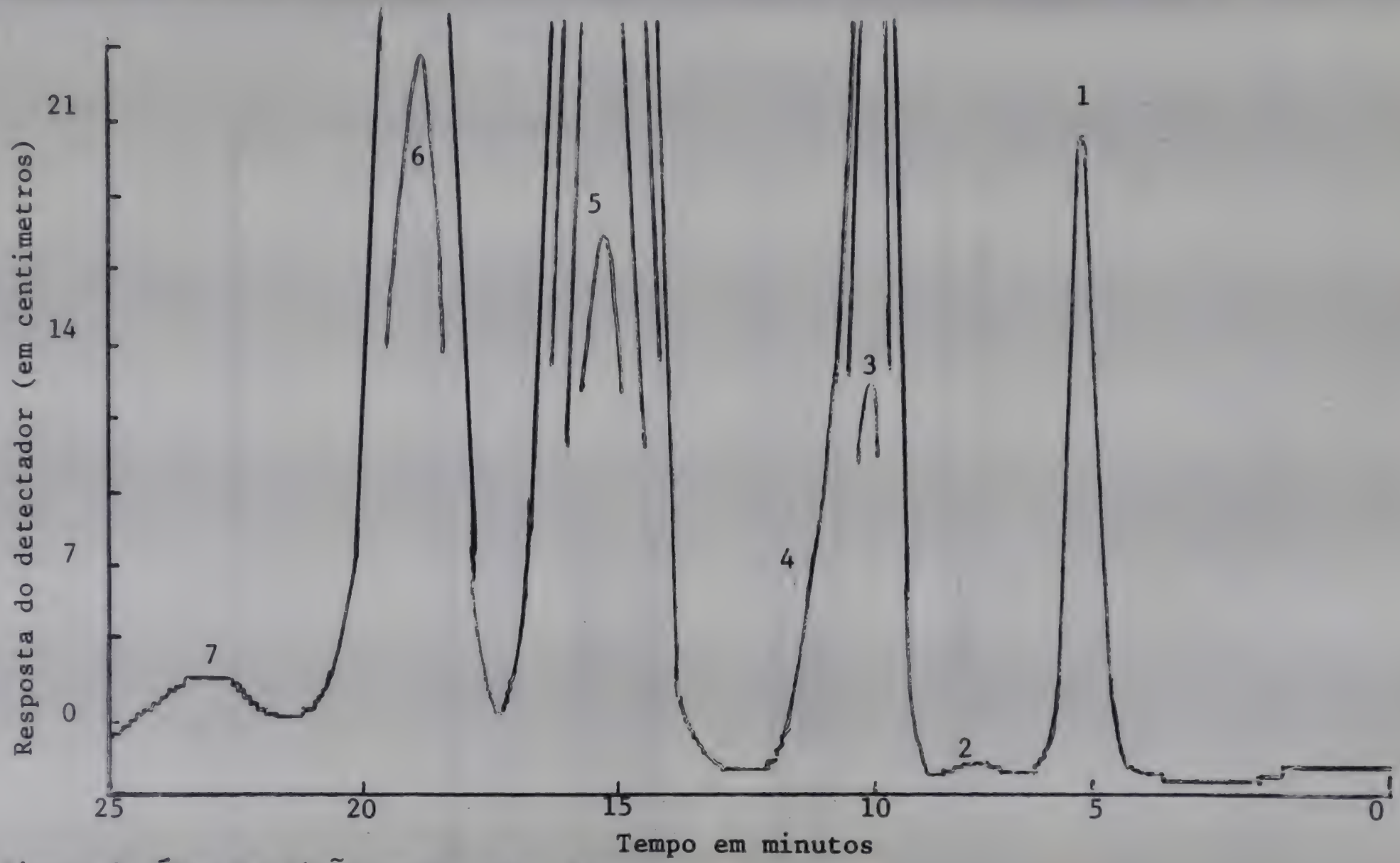


Figura 3. Óleo de limão verde, var. Taiti.

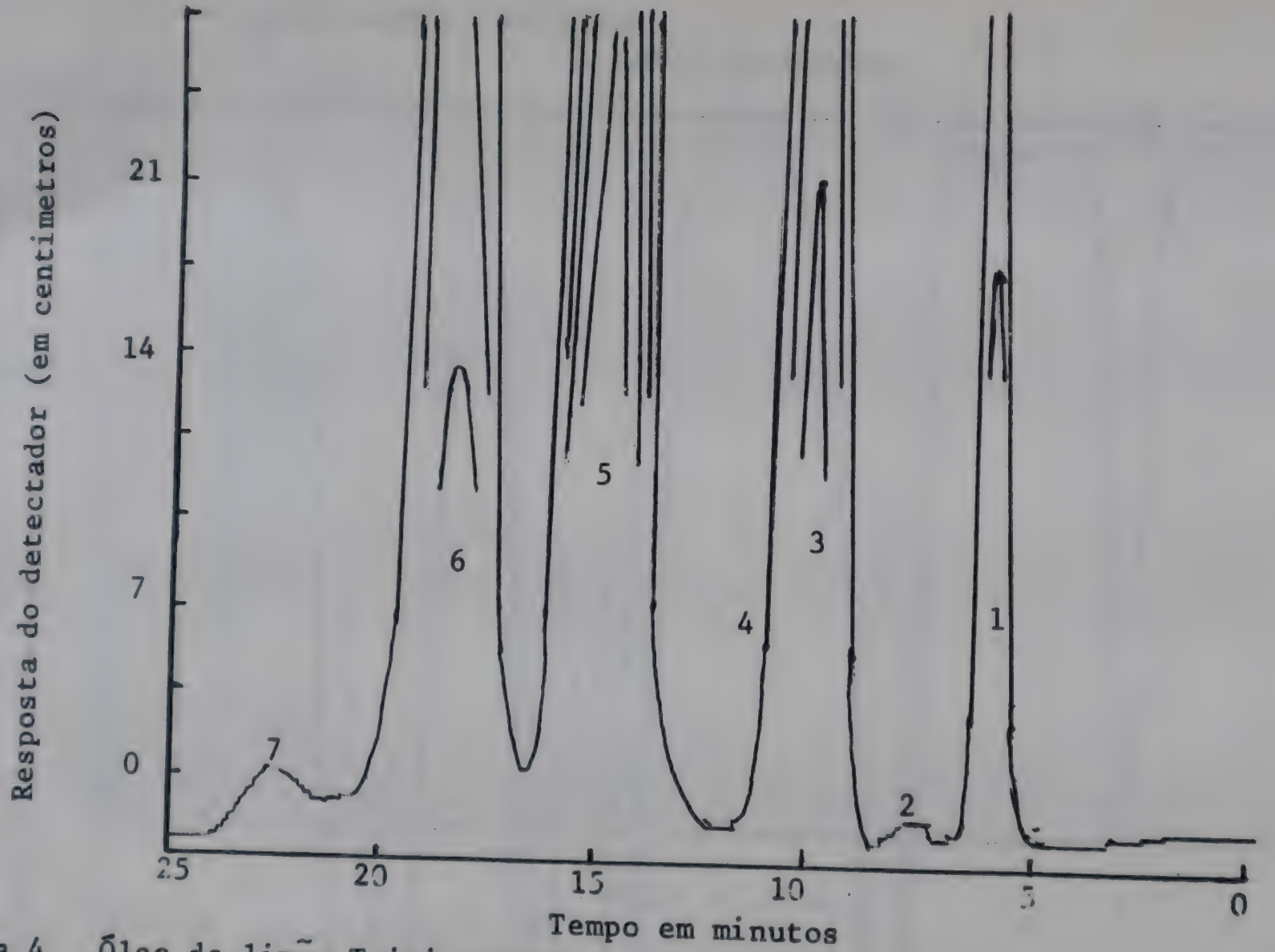


Figura 4. Óleo de limão Taiti maduro.

LITERATURA

1. BERNHARD, R.A. Citrus Flavors. Volatile Constituints of the essential oils of the oranges. Jour. Food Sci. 26: 401-411, 1961.

2. BURCHFIELD, H. P. & STORS, E. E. Biochemical Application of gas chromatography -Essential Oils. Academic Press, New York, 1952.

3. RYMAL, K.S., WOLFORD, R.W., AHMED, E.M.& DENNISON, R.A. Changes in Volatile Flavor Constituints of Canned Single. Strength Orange Juice as Influenced by Storage Temperature. Food Technology 22: 1592-1595, 1968.

4. SWIFT, L.J. Determination of Linalool and alfa terpineol in FLorida orange products. Jour. Agric. Food Chem. 10: 297-301, 1962.

5. WOLFORD, R.W. & ALBERDING, C.E. Analysis of recovered natural orange essence by gas chromatography. Jour. Agric. Food Chem. 10: 297-301, 1962.

6. _____, ATTAWAY, J.A., ALBERDING, C. R. & ATKINS, A.D. Analysis of the flavor and arome constituents of Florida orange juice. Jour. Food Sci. 28: 320-328, 1963.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/70

O CÁLCIO NO VINHO :

Causas de enriquecimento e meios de eliminação (*)

Takuo Hashizume

RESUMO

O cálcio é normalmente presente no vinho. Durante as fases de vinificação e envelhecimento, precipita-se sob a forma de tartarato de cálcio. Porém, o seu teor pode ser aumentado em função dos tratamentos que o vinho recebe até o momento do engarrafamento. Esse aumento poderá favorecer novas precipitações no vinho engarrafado, depreciando-o. Os produtos de colagem utilizados na enologia, não apresentaram aumentos de cálcio que comprometessem a estabilidade do vinho.

A eliminação parcial do cálcio permite estabilizar o vinho novo, permitindo o seu engarrafamento antecipado, sem o risco de precipitação na garrafa. Dentre os vários processos de eliminação de cálcio estudados, o melhor foi a utilização da resina trocadora de iontes, quando os iontes de cálcio e potássio foram parcialmente substituídos pelos iontes de sódio e magnésio.

Foram comparados sete métodos analíticos de determinação de teores de cálcio de vinho, dentre os quais o método com EDTA, que foi utilizado no presente estudo.

(*) Trabalho apresentado para obtenção do Diploma Nacional de Enologia - Universidade de Bordeaux - França.

SUMMARY

CALCIUM IN WINE: CAUSES OF ENRICHMENT AND METHODS OF ELIMINATION. *Calcium is normally presented in tartrate. Therefore, the quantity of Calcium can be increased according to the treatments the wine receives until bottling. This increase can contribute to a new precipitation in the bottled wine, demaging the final product.*

The finning agents used by the winemakers did not increase the calcium precipitate to the point that could affect the wine stability. Also, the parcial elimination of calcium permit to stabilize the new wines and to anticipate the bottling operation without the risk of its precipitation in the bottle.

Among the several procedures that were studied the utilization of ion exchange resins presented the best results once it permits the replacement of part of calcium and potassium ions by sodium and magnesium, reducing the tartrates precipitation.

Seven methods of calcium determination in wine were compared; among them, the method with EDTA was used for this paper.

INTRODUÇÃO

Como as demais matérias minerais do vinho, o cálcio se localiza, sobretudo, nas partes sólidas da uva (4). Dessa forma, a vinificação em tinto aumenta o seu teor em cálcio pela dissolução durante esta operação, o mesmo podendo ocorrer com os tratamentos e a manipulação do vinho em contacto com certos materiais. Por outro lado, sabe-se que o teor em cálcio diminui à medida que a solubilidade do tartarato de cálcio

decresce, pela formação de álcool, durante a fermentação, e pelo resfriamento do vinho (4).

Durante a conservação, os depósitos cristalizados aparecem principalmente no decorrer do primeiro inverno e as precipitações se prolongam, às vêzes, no decorrer do segundo ano, porém, os cristais de tartarato de cálcio podem aparecer o ano todo. Essas precipitações têm o caráter de uma estabilização, favorável ainda do ponto-de-vista gustativo, pois são acompanhadas de uma desacidificação, que se deve facilitar, quando intervém em vinhos mantidos em barris ou cubas; por outro lado, tornam-se acidentais se produzidas quando o vinho está engarrafado. O vinho permanece perfeitamente límpido, mas forma-se um depósito branco mais ou menos abundante, sob forma de placas ou de pó brilhante, que se sedimenta ràpidamente quando se inverte a garrafa (4).

OBJETIVOS DA PESQUISA

I - Métodos de dosagem do cálcio de vinho

Inicialmente, procurou-se comparar os diferentes métodos de dosagem do cálcio de vinho, escolhedo - se, a seguir, um método para ser seguido em tôdas as análises do presente trabalho.

II - Meios de eliminação do cálcio de vinho

Atualmente, pelo menos na França, por causa de necessidades econômicas e por questões de gôsto, os vinhos são engarrafados mais cedo e, portanto, são mais fàcilmente sujeitos aos acidentes antes mencionados. Desta maneira, foram pesquisados diferentes meios de eliminação do cálcio do vinho, a fim de permitir o engarrafamento precoce, sem qualquer inconveniente.

III - Causas de enriquecimento do cálcio do vinho

A vinificação e a conservação em cuba de cimento, o emprêgo eventual de desacidificantes e o tratamento de vinhos com certos produtos minerais, também favorecem muito os enriquecimentos em cálcio (4). A êste respeito, procurou-se tratar o vinho com diferentes produtos minerais enológicos, atualmente utilizados correntemente, assim como o tratamento para eliminar o ferro e que necessita da utilização de produtos contendo cálcio.

MÉTODOS DE DOSAGEM DO CÁLCIO

Analisou-se o cálcio de diversos vinhos, por sete métodos diferentes. Sem se ter comparado estatìsticamente os resultados obtidos, escolheu-se um dêles para seguir o presente trabalho.

1. Métodos

a) Precipitação do oxalato de cálcio no vinho (100 ml) e titulação manganimétrica (3) (Vinho-Oxal-Mn); adiciona-se uma pitada de NH_4Cl, antes da colocação do oxalato, a fim de se evitar a precipitação do magnésio.

b) Precipitação do oxalato de cálcio no vinho, seguida de titulação gravimétrica após calcinação a 800ºC (Vinho-Oxal-Grav 800ºC). Segue-se o método precedente, depois a calcinação do oxalato de cálcio a 800ºC e, finalmente, a pesagem.

c) Precipitação do oxalato de cálcio na cinza (100 ml), depois manganimetria (3) (Vinho-cinza-Oxal-Mn).

d) Precipitação do oxalato de cálcio na cinza (100 ml), seguida de titulagem gravimétrica após a calcinação (Vinho-Cinza-Oxal-Grav 800ºC). Associação dos métodos b e c.

e) Precipitação do oxalato de cálcio de cinza (100 ml), seguida de titulagem gravimétrica após a secagem do oxalato a 100ºC (Vinho-cinza-Oxal-Grav 100ºC). Separa-se o oxalato sôbre filtro de vidro com placa de porcelana e depois seca-se em estufa a 100)C, durante 24 horas.

f) Dosagem complexométrica do cálcio na cinza (Vinho-cinza-complexometria).

Princípio. Uma solução alcalina (potassa) o HHSNN (ácido calcone carbônico) forma com os iontes Ca^{++} uma coloração rosa. Quando os iontes Ca^{++} são complexados por intermédio de EDTA (etileno-aminotetraacetato dissódico) ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8, 2H_2O$), reconstitui-se o sal de potássio de HHSNN.

Reativos. HCl a 1/10; hidróxido de potássio a 20%; HHSNN em pó (0,5 g de HHSNN + 50 g de sulfato de sódio RP); solução de magnésio para sensibilizar a viragem (1 ml a 6% de $MgSO_4, 7H_2O$); solução de EDTA 4 g/l (pesar com precisão: adicionar cêrca de 800 ml de água destilada fria, agitar enèrgicamente; preparar 2 dias antes, pois a dissolução é lenta; completar o volume a um litro. Esta solução é muito estável); solução-padrão de cálcio (dissolver 2,500 g de $CaCO_3$ purificado, com 10 ml de HCl 1/1 e completar o volume a um litro: 1 ml contém 1 mg de Ca). Teòricamente, 23,3 ml de solução de EDTA correspondem a 10 mg de Ca.

Dosagem. Fazer a cinza de 25 ml de vinho a 600 - 650ºC. Dissolver a cinza da cápsula com 5 ml HCl a 1/10 a quente e recolher em Erlenmayer de 300 ml (certificar-se prèviamente, que está isento de fenolftaleína), levando-se a cápsula com um volume total de água de 45 ml. Deixar esfriar, se necessário. Neutralizar com a solução de potassa em presença de um fragmento de papel tournesol. Adicionar 1 ml de solução magnesiana, depois verter 8 ml de potassa a 20%. Colocar uma pitada de HHSNN, titular imediatamente com EDTA, agitando-se enèrgicamente. Readicionar uma pitada de HHSNN, quando a coloração rosa passa para vio-

leta-palha. Parar a adição de EDTA quando a coloração se tornar azul-celeste (o desaparecimento de tonalidade rosa se deve aos iontes Ca^{++}). Seja n ml (terminar a titulação com muito cuidado) para padronizar a solução de EDTA, em relação ao cálcio-padrão nas mesmas condições.

Se 10 ml da solução-padrão de Ca, isto é, 10 mg de Ca correspondem a N ml do EDTA:

$$\text{Ca mg/l de vinho} = \frac{10 \times n \times 1.000}{N \times 25} = 400 \frac{n}{N} =$$

$$\frac{400}{23,3} n = 17,167 \times n.$$

g) Dosagem complexométrica após a fixação dos cationtes de 25 ml de vinho na resina catiônica e eluição ácida (Vinho-resina-complexometria).

Passagem na resina trocadora de cationtes

No fundo de uma bureta com torneira de 25 ml, coloca-se uma pequena mecha de lã de vidro e, em seguida, introduzem-se 7 g de resina Dowex 50, prèviamente intumescida em água destilada durante 24 horas. Constitui-se, assim, uma coluna que será mantida constantemente cheia de água destilada. Essa coluna é tratada com 50 ml de ácido clorídrico 5 N, para liberar todos os grupamentos ácidos da resina. Em seguida é lavada com água destilada, até que a água de lavagem escoada não apresente mais reação com nitrato de prata. Passam-se, então, 25 ml de vinho à razão de aproximadamente 1 ml por minuto, seguida de lavagem da coluna com 50 ml de água destilada. Efetuar eluição com 100 ml de ácido clorídrico 5 N, à razão de 3 ml por minuto, recolhendo-se, cuidadosamente, todo o líquido em Erlenmayer de 500 ml. Nesta solução, procede-se à dosagem com EDTA, como no método F. Deve-se resfriar após a neutralização com potassa, antes de se efetuar

a titulação com EDTA; o cálculo é o mesmo do método precedente. Após lavagem da coluna com a água destilada, como mencionado antes, pode-se efetuar a dosagem seguinte.

2. Dosagem de cálcio do vinho por diferentes métodos:

Determinamos o teor de cálcio de 6 vinhos diferentes pelos sete métodos antes mencionados (ver quadro 1).

Quadro 1. Dosagem de cálcio por diferentes métodos (mg de cálcio por litro.

Métodos	Tipos de vinho					
	Branco licor.	Branco sêco	Tinto 1	Tinto 2	Tinto 3	Tinto 4
A - Vinho - oxal - Mn	134	126	148	144	128	140
B - Vinho - oxal - grav (800° C) (*)	140	133	166	161	135	142
C - Vinho - cinza - oxal - Mn	131	120	136	134	122	128
D - Vinho - cinza - oxal - grav (800°C (*)	137	123	158	153	132	140
E - Vinho - cinza - oxal - grav (100°C (**)	149	139	177	173	145	149
F - Vinho - cinza - complexometria	137	128	172	170	125	134
G - Vinho - resina - complexometria	135	127	176	174	128	139
Média	137,5	128	162	158,5	131	139
(*) Conversão de CaO, obtido em mg/l de cálcio .						
(**) Conversão de $(COO)_2Ca$, obtido em mg/l de calcio.						
E' - Vinho - cinza - oxal - MN (100°C) (***)	131	122	155	152	127	131
Média	135	125,5	159	155,5	128	136
(***) Conversão de $(COO)_2Ca,H_2$), obtido em mg/l de cálcio.						

Sem interpretação estatística pode-se dizer que, os resultados obtidos em cada método, apresentaram variações consideráveis.

Verificou-se que os dados obtidos pelo método C, são sempre os mais baixos; por outro lado, são os mais altos pelo método E.

Variações dos resultados

a) No caso de vinho branco sêco e licoroso, a variação extrema foi da ordem de 20 mg/1.

b) No caso de vinhos tintos 1 e 2, a variação foi da ordem de 40 mg/1.

c) No caso de vinhos tintos 3 e 4, a variação foi da ordem de 20 mg/1.

3. Comentários dos métodos:

Método A. Sem dúvida, êste método é o mais cômodo, mas para o presente trabalho, verificou-se a inconveniência de exigir um volume relativamente elevado para cada análise. Constatou-se a dificuldade de filtração para os vinhos licorosos e a dificuldade de observar o ponto final da titulação nos casos de vinhos tintos.

Método B. Mesma dificuldade de filtração e mais demorado do que A.

Método C. Com êste, constatou-se sempre que os resultados eram mais baixos. Os inconvenientes são a necessidade de um volume tão elevado como os dois métodos anteriores e a dificuldade de obter a cinza de 100 ml de vinho, notadamente para os vinhos licororos.

Método D. Mesma dificuldade e mais demorado que C.

Método E. Com êste, constatou-se, sempre, os resultados mais altos. Refletindo-se sôbre o problema parece que os dados mais elevados obtidos com êste método provém da água de cristalização do oxalato, que não é totalmente eliminada no período de 24 horas a 100ºC, porque o precipitado obtido é um oxalato com uma molécula de água: $(COO)_2Ca.H_2O$. Os cálculos do cálcio, a partir de $(COO)_2Ca.H_2O$, estão no rodapé do Quadro 1.

Método F. Escolheu-se êste para obter todos os dados analíticos do presente trabalho, visto requerer sòmente 25 ml de vinho, dos quais é mais fácil de se obter as cinzas. Embora o tempo necessário seja demasiado longo, a titulação é mais cômoda.

Método G. Procurou-se modificar um pouco o método anterior, substituindo a calcinação pela fixação do cálcio na resina, seguida de eluição ácida. Dessa maneira, há possibilidade de não se utilizar a mufla. Para abreviar o tempo de eluição, o ácido clorídrico 2N, que era insuficiente para eluir completamente o cálcio e dava resultados irregulares, foi substituído por ácido clorídrico 5 N. Mas, mesmo assim, necessita-se de um volume um tanto elevado. Os resultados obtidos são semelhantes aos do método anterior. Em caso de vinhos brancos, êsse método é válido mas, para os vinhos tintos, as matérias corantes eluídas pelo ácido, dificultam a titulação do cálcio, oferecendo dificuldades à observação do ponto de viragem.

MEIOS DE ELIMINAÇÃO DO CÁLCIO DO VINHO

1. Condições de precipitação do racemato de cálcio

Procurou-se conhecer por ensaio as condições de precipitação do racemato de cálcio no meio sintético seguinte:

- 5 ml de ácido tartárico racêmico a 1%;
- 2 ml de acetato de cálcio preparado da seguinte forma: 16 ml de carbonato de cálcio são dissolvidos com 120 ml de ácido acético diluído; em seguida, completa-se o volume a um litro (dosagem de ácido tartárico pelo método Kling-Peynaud (3).
- 100 ml de água destilada.

Os pH foram modificados com HCl ou NaOH. Filtrou-se, a seguir, em filtro de vidro com placa de porcelana ao término de 24 horas e 8 dias. Secou-se a 90ºC, durante 48 horas, seguindo-se a pesagem.

Quadro 2. Condição de precipitação de racemato de cálcio em meio sintético com variação de pH.

Dosagem do precipitado	pH				
	3,0	3,2	3,4	3,6	3,8
	mg	mg	mg	mg	mg
Após 24 horas	17,8	30,0	43,0	53,1	58,4
Após 8 dias	28,4	40,6	51,4	58,5	64,6

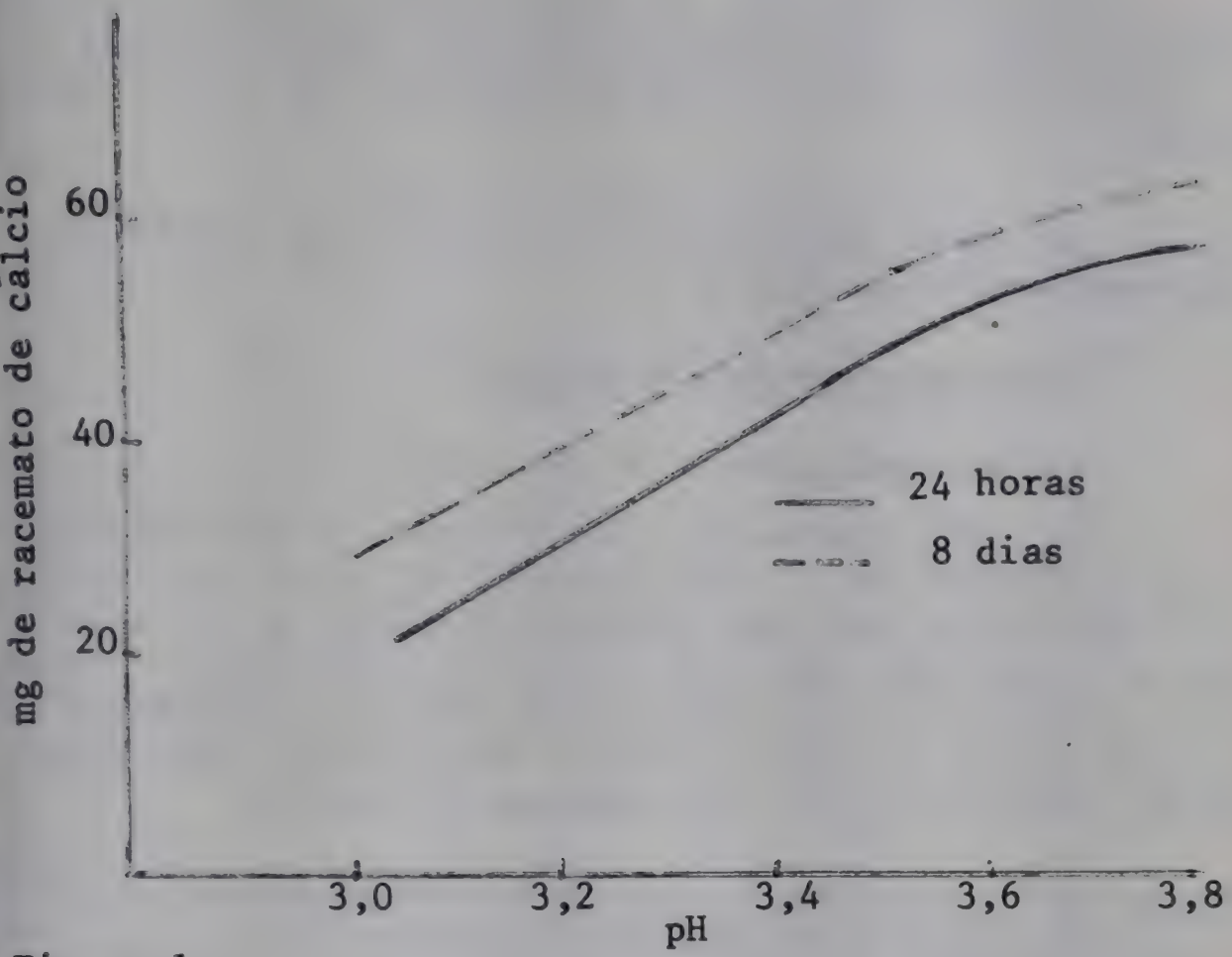


Figura 1.

Constatou-se, segundo o Quadro 2 e a Figura 1, que o pH do meio exerce uma influência na precipitação do racemato de cálcio. À medida que o pH se eleva para 3,8, a precipitação é mais favorável.

Decorridas 24 h, a formação e a precipitação de racemato de cálcio não são suficientes e no final de 8 dias a precipitação é total, porque, teòricamente, a precipitação total esperada é de 63 mg de racemato de cálcio.

2. Tratamento do vinho com ácido tartárico L (TL) e ácido tartárico racêmico (TR).

DE ROSA foi quem pela primeira vez experimentou o ácido tartárico racêmico como reativo específico para a precipitação de cálcio do vinho, em substituição ao ácido oxálico, muito tóxico e perigoso. Por outro lado, o ácido tartárico racêmico não é tóxico.

Experimentou-se em dois vinhos tintos e dois vinhos brancos. Em relação aos dois vinhos tintos e ao vinho branco sêco, foram enriquecidos em cálcio com $CaCl_2$.

As doses utilizadas e os resultados analíticos são mencionados no Quadro 3.

Modo de condução do ensaio:

a) Determinação de pH dos vinhos.

b) Cada tratamento, assim como o testemunha, foram colocados em 1/2 garrafa (375 ml) e no fim de 8 dias efetuou-se uma nova dosagem de cálcio e trasfegou-se o restante para 1/4 de litro; decorridos 30 dias, efetuou-se outra dosagem de cálcio e trasfegou-se para 1/4 de garrafa (180 ml); finalmente, após três meses, efetuou-se uma nova dosagem de cálcio.

Quadro 3A. Porcentagens de cálcio eliminado em relação ao cálcio teòricamente eliminado.

TRATAMENTO	Vinho branco		Vinho tinto	
	Licoroso	Sêco		
	pH 3,40	pH 3,25	pH 3,35	pH 3,15
mg/l	%	%	%	%
100 (TR)	57,6	23,0	50	61,5
200 (TR)	86,5	92,3	90,4	76,9
100 (TG)	100,0	94,2	92,3	80,8
200 (TG)	93,3	73,1	79,8	74,0

Quadro 3. (1a. Parte) Tratamento de diferentes vinhos brancos com ácido tartárico L(TG) e ácido tartárico racêmico (TR).

Tratamento	Dias 0	8	30	90	Cálcio eliminado	Cálcio eliminado teòricamente (*)
	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
Vinho Branco Licoroso pH = 3,4						
Testemunha (mg/l)	137	137	137	137	-	-
100 (TR)	-	117	115	112	15	26
200 (TR)	-	93	92	92	45	52
100 (TG)	-	81	80	80	57	52
200 (TG)	-	40	40	40	97	104
Vinho Branco Sêco pH = 3,25						
Testemunha (mg/l)	112	112	112	112	-	-
100 (TR)	-	96	95	94	6	26
200 (TR)	-	64	63	63	48	52
100 (TG)	-	63	62	62	49	52
200 (TG)	-	36	36	36	76	104

(*) Cálculo feito, sabendo-se que uma molécula de racemato de cálcio é formada por duas moléculas de ácido tartárico e duas moléculas de cálcio.

Quadro 3. (2a. Parte) Tratamento de diferentes vinhos tintos com ácido tartárico L(TG) e ácido tartárico racêmico (TR).

Tratamento	Dias 0	8	30	90	Cálcio eliminado	Cálcio eliminado teòricamente (*)
	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
Vinho Tinto pH = 3,35						
Testemunha (mg/l)	120	117	115	115	5	-
100 (TR)	-	114	109	107	13	26
200 (TR	-	74	73	73	47	52
100 (TG)	-	72	72	72	48	52
200 (TG)	-	38	37	37	83	104
Vinho Tinto pH = 3,15						
Testemunha (mg/l)	120	117	116	116	4	-
100 (TR)	-	112	105	104	16	26
200 (TR)	-	81	80	80	40	52
100 (TG)	-	79	79	78	41	52
200 (TG)	-	44	43	43	77	104

(*) Cálculo feito, sabendo-se que uma molécula de racemato de cálcio é formada por duas moléculas de ácido tartárico e duas moléculas de cálcio.

Interpretando os resultados obtidos, mencionados nos Quadros 3 e 3-A, pode-se concluir, dos resultados, o seguinte:

a) Segundo o pH do vinho, a eliminação do cálcio sôbre a forma de racemato de cálcio varia, sobretudo nos tratamentos com ácido tartárico L, como se viu no Quadro 2. Para o vinho de pH mais elevado, a eliminação do cálcio é mais importante.

b) Ao fim de 8 dias, verificou-se que a formação e a precipitação de racemato de cálcio foram quase que totais em todos os vinhos ensaiados.

c) Como havia sido previsto, o ácido tartárico L é mais eficaz que o ácido tartárico racêmico. Em outras palavras, pode-se dizer que a eficiência do ácido tartárico L é duas vêzes maior.

d) Teòricamente, em todos os tratamentos há um excesso de ácido tartárico racêmico, mas não se conseguiu detectá-lo por simples adição de cálcio no final de 90 dias. Pode-se dizer que, em função do pH do vinho, os ácidos tartáricos racêmicos restantes mantêm-se estáveis, mesmo em presença de cálcio.

3) Tratamento por trocadores de cationtes.

Experimentou-se no mesmo vinho branco sêco límpido (para evitar a colmatagem da resina) em pequeno volume, respeitando, porém, a relação volume do vinho tratado/volume de resina utilizada industrialmente. Utilizou-se a resina Dowex 50, efetuando-se as regenerações seguintes:

a) com 100% de solução 10% de NaCl

b) com 100% de solução 10% de KCl

c) com 100% de solução 10% de $MgCl_2$

d) 50% de solução 10% de NaCl + 50% de solução 10% de KCl

e) 50% de solução 10% de NaCl + 50% de solução 10% de $MgCl_2$

f) 50% de solução 10% de KCl + 50% de solução 10% de $MgCl_2$

g) 1/3 de solução 10% de KCl + 1/3 de solução 10% de $MgCl_2$ + 1/3 de solução 10% de NaCl

h) 5% de solução 10% de NaCl + 15% de solução 10% de KCl + 80% de solução 10% de $MgCl_2$

Dados de operações

a) Volume de resina: 8 ml Dowex 50

b) Vinho tratado: 40 vêzes o volume da resina 320 ml)

c) Fluxo do tratamento: 12 vêzes o volume da resina por hora (96 ml/h)

d) Regeneração da resina segundo Ribereau-Goyon & Peynaud (3).

Quadro 4. Tratamento pelos trocadores de cationtes efetuando as diferentes regenerações.

Elementos trocadores meq/l	Vinho testemunha	Diferentes regenerações							
		NaCl 100%	KCl 100%	$MgCl_2$ 100%	NaCl 50% + KCl 50 %	NaCl 50% + $MgCl_2$ 50 %	KCl 50 % + MgCl 50 %	KCl 1/3 + NaCl 1/3 + $MgCl_2$ 1/3	NaCl 5 % + KCl 15 % + $MgCl_2$ 80 %
Na	17,4	61,0	12,2	17,4	38,2	22,8	15,2	22,8	20,0
Ca	5,75	0,65	0,75	0,65	0,75	0,55	0,5	0,55	0,60
K	23,0	5,6	46,2	16,4	29,8	18,0	30,8	28,2	40,5
Mg	4,5	2,5	3,0	10,1	2,7	7,2	7,5	5,7	8,1

Pode-se interpretar o Quadro 4 da seguinte maneira:

a) Em oito diferentes formas de regeneração, constatou-se que os teores de cálcio eliminados são quase idênticos. Pode-se considerar que têm a mesma eficiência em relação à estabilização do cálcio.

b) Por outro lado, cada tratamento apresenta o inconveniente de enriquecer com um outro metal, mas o tratamento efetuado com regeneração mista entre 50% de NaCl e 50% de $MgCl_2$ parece ser o mais conveniente, porque o Na e o Mg enriquecidos são físicamente estáveis no vinho e, ao mesmo tempo, diminuem o K e Ca responsáveis pela precipitação tartárica.

c) Em relação á regeneração com o sal de K, há sempre enriquecimento dêsse metal e deixa-se o vinho físicamente menos estável sôbre o plano da precipitação tartárica.

Determinaram-se os teores de Na, Ca, K e Mg no espectrofotômetro de chama Yvon-Jobin.

CAUSAS DE ENRIQUECIMENTO DE CÁLCIO DO VINHO

Experimentaram-se diversos produtos enológicos, com exceção do $CaCO_3$ empregado na desacidificação do mosto.

1. Tratamento com fitato de cálcio

Sob forma de sal duplo de cálcio e magnésio, o ácido fítico constitui a fitina, forma de reserva do fósforo que se encontra muito espalhado nos vegetais, particularmente nos tegumentos externos dos grãos (4).

O fitato de cálcio se apresenta na forma de um pó branco, muito solúvel na água, difícilmente e incompletamente solúvel no vinho e solúvel nos ácidos (4).

A pureza dos produtos comerciais não ultrapassa de 80% (4).

O fitato é adicionado ao vinho aerado, que contém o ferro III. Produz-se rapidamente uma precipitação "fitato-férrico". A reação é a seguinte:

$$C_6H_{24}O_{27}P_6Ca_6 + 4Fe\ III \longrightarrow C_6H_{18}O_{24}P_6Fe_4 + 3H_2O + 6\ Ca^{++}$$

Teòricamente, 1 mg de Fe férrico se combina com 4,2 mg de fitato de cálcio, mas, na realidade, precisa-se de 5 mg dêste produto, para eliminar 1 mg de Fe III (4).

Segundo RIBEREAU-GAYON e PEYNAUD (4), quando se trata da aplicação prática, apresenta as seguintes conclusões importantes:

1º - Sòmente o ferro no estado férrico é eliminado.

2º - 4 a 5 mg de fitato são necessários para eliminar 1 mg de ferro férrico.

3º - O cobre não é eliminado nas condições de pH do vinho.

4º - A precipitação do ferro é progressiva, porque é limitada pela deslocação do equilíbrio ferro ferroso-ferro férrico no sentido da formação de ferro férrico. Daí o interêsse de arejar o vinho diversas vêzes, durante e após o tratamento.

5º - Todo o fitato em excesso está sujeito a provocar uma nova precipitação, se o mesmo vinho sofrer enriquecimento acidental em ferro.

Segundo PEYNAUD (curso de Diploma Nacional de Enólogo 68-69), o nôvo método de tratamento para êsse produto é:

1º - Arejar o vinho

2º - Alguns dias depois, dosar o ferro férrico.

3º - Multiplicar por 5 o teor de ferro férrico e depois subtrair 10 (margem de segurança).

4º - Dissolução de fitato em ácido cítrico ou ácido clorídrico, a quente, se necessário.

5º - Depois colagem e para terminar a filtração.

Modo de tratamento. No vinho branco sêco, efetuaram-se várias doses de tratamento com fitato de cálcio.

Para calcular as doses de fitato, analisou-se, primeiramente, o ferro total e ferro III pelo método de tiocianato de potássio (3); em seguida, tratou-se com as doses extremas, isto é, em função do ferro total e do ferro III (com margem de segurança) e os intermediários, como indica o Quadro 5.

Quadro 5. Tratamento pelo fitato de cálcio.

Dose de fitato de cálcio	CÁLCIO			Ferro total		Prova de excesso de fitato (*)
	Antes	Depois	Diferença	Antes	Depois	
(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	
75	126	135	9	25	12	Não
85	126	138	12	-	11	Mínimo
95	126	140	14	-	10	Sim
105	126	141	15	-	9	Sim
115	126	143	17	-	9	Sim
125	126	144	18	-	8	Sim

(*) Tomam-se 20 cm^3 de cada tratamento e adiciona-se uma gota de solução saturada de alúmen de ferro.

O teor em ferro total foi de 25 mg/l (enriquecido com $FeCl_3$) e o de ferro III, após a aeração, foi de 16 mg/l.

Não se pode, no presente trabalho. generalizar a grandeza do enriquecimento em cálcio, mas se pode afirmar que ocorre o fenômeno, como demonstra o quadro 5 e, sobretudo, o enriquecimento de cálcio é maior à medida que se aumenta a dose de fitato empregado.

O presente trabalho permite a conclusão seguinte: quando se emprega o fitato com a técnica moderna, o enriquecimento em cálcio é relativamente fraco e há uma boa desferragem, sem problema de excesso de fitato.

Por outro lado, verificou-se que, com outros tratamentos,o enriquecimento em cálcio aumenta e as provas de excesso de fitato são positivas.

2. Tratamento do vinho com terra de infusório

A terra de infusório provém de depósitos silicosos, constituídos pelo acúmulo de carrapaças fossilizadas de diatomáceas ou algas microscópicas. A diatomácea se encontra na natureza sob a forma de uma rocha da côr branca, mais ou menos pura, leve, macia e de estrutura porosa. Após o tratamento da rocha, os esqueletos de diatomáceas, ou seus detritos, constituem um pó de extrema porosidade. Disso resulta que, na camada filtrante, a parte porosa ocupa 80% da massa total, propriedade muito favorável à filtração (4).

Utilizou-se êsse produto para a filtração de vinho, fazendo-se uma camada filtrante sôbre um tecido. Costuma-se, geralmente, para fazer esta camada, incorporá-lo ao primeiro vinho que a atravessa e, durante a filtração, incorporar continuamente uma pequena quantidade dêsse produto no vinho turvo, a fim de evitar a colmatagem.

Atualmente, a filtração do vinho com êsse produto é muito difundida, porque se pode obter sempre a limpidez perfeita e de maneira definitiva, mesmo com vinho turvo.

Há, evidentemente, diferentes qualidades, segundo sua eficiência e segundo a impureza presente.

O produto destinado à filtração de vinhos deve ser neutro, inatacável pelo ácidos do vinho e isento de matéria orgânica, carbonato de cálcio e ferro.

Segundo os autores (2 e 4), algumas terras de infusórios cedem sais de sódio ao vinho, o que pode modificar a sua qualidade.

Foram experimentadas nove terras de infusórios existentes no comércio, a fim de verificar se havia enriquecimento de cálcio durante a sua utilização.

Modo de tratamento. A operação foi conduzida da seguinte maneira:

a) Quantidade de terra de infusório empregada à razão de 1 g/litro de vinho;

b) Deixou-se em contacto com o vinho durante 3 horas, com agitação contínua e sem agitação.

Quadro 6. Tratamento do vinho com terra de infusório (1 g/litro) e durante três horas, com e sem agitação.

Tipos de terra de infusório	Cálcio antes(*)	C/agitação (*)	S/agitação (*)
1. Hyflo-Super-Cel	127	130	129
2. Diatose-Super-fina	-	127	127
3. Kieselguhr Super V	-	129	128
4. Kieselguhr Super III	-	145	140
5. Rose Diatomis	-	135	130
6. Spindalite X	-	129	128
7. D 8	-	135	129
8. A 6	-	130	129
9. A 8 A	-	129	127

(*) (mg/1).

Segundo o Quadro 6, pode-se concluir o seguinte:

De maneira geral constatou-se que havia enriquecimento em cálcio, mas que se podia considerar desprezível. Constatou-se, porém, em três amostras, que havia enriquecimento considerável em cálcio, sobretudo quando se tratou com agitação e uma amostra sem agitação.

Desta forma, pode-se dizer que apesar da existência de tratamento eficaz por êste produto, o cálcio não é totalmente eliminado. Mas, pode-se considerar que esta quantidade de cálcio, que pôde enriquecer o vinho durante o tratamento, é desprezível, sem ser nociva do ponto-de-vista físico do vinho.

3. Tratamento do vinho com placas filtrantes

Utiliza-se êsse tipo de filtro, a fim de se eliminarem as turvações mais finas do vinho, no caso de vinhos já quase claros, que se deseja tornar perfeitamente límpidos, no momento do engarrafamento. São fabricadas para pronto uso e portadas por placas coletoras apropriadas.

A eficiência das placas repousa nos efeitos tamizantes e adsorbantes.

As matérias-primas utilizadas para a fabricação de placas são constituídas por filtros finos, especialmente tratados: amianto, celulose de algodão e, em alguns casos, misturas de diatomáceas.

As diferentes porosidades são definidas por números, sendo que, os mais baixos, correspondem a porosidades mais altas e a fluxos de filtragem maiores.

Os fabricantes dêsse tipo de material, especificam que essas placas são tratadas especialmente para evitar qualquer enriquecimento em ferro, cobre e cálcio, nocivos a certos líquidos.

O objetivo do presente trabalho é o de verificar essa última afirmativa dos fabricantes, principalmente no concernente ao cálcio.

Modo de tratamento

Foram experimentadas 16 placas de diversas fabricações e de diferentes gamas de porosidade.

Utilizou-se sòmente um tipo de vinho branco sêco, quase límpido.

O método da dosagem do cálcio foi aquêle mencionado no início, isto é, complexometria sôbre as cinzas.

Dois tratamentos foram efetuados:

a) Maceração durante 24 horas no vinho, à razão de 1 g de placa/litro, que se rasgou em pequenos pedaços;

b) Filtração fracionada: para cada placa, testou-se, inicialmente, a grosso modo, a curva de colmatagem; depois, o volume total foi dividido em quatro frações do mesmo volume.

A filtração foi feita com um aparelho de laboratório, que permitia controlar a pressão sôbre uma superfície filtrante constante. Fixou-se a pressão em 500 g/cm^2 e a superfície filtrante em 16 cm^2.

Quadro 7. Tratamentos de vinho com placa filtrante. Teor do cálcio do vinho-testemunha 127 mg/litro.

TIPOS DE PLACAS	Maceração 1 g/l (*) (mg/l)	Filtração fracionada (**)				Media de quatro frações
		1a.	2a.	3a.	4a.	
1 - Beco K5	133	131	130	130	130	130
2 - Beco K7	130	127	127	127	127	127
3 - Beco K5 GASQUET	129	132	129	127	127	129
4 - Beco K 10	129	132	131	127	126	132
5 - Beco Steril /S	130	135	132	130	129	132
6- Filtrox - 3	136	131	130	129	127	129
7 - Fibra Fix - X5	129	127	126	126	126	126
8 - Filtrox - 7	130	135	130	129	129	131
9 - HP/EK - CARLSON	131	128	128	127	126	127
10 - HP/8 - CARLSON	130	127	128	126	126	127
11 - HP/7 - CARLSON	134	130	127	127	127	128
12 - HP/5 - CARLSON	132	132	128	126	126	128
13 - HP/3 - CARLSON	133	132	128	131	130	130
14 - HP/2 - CARLSON	134	126	129	130	129	128
15 - HP/SIO - CARLSON	132	134	132	126	128	130
16 - HP/O - CARLSON	132	127	131	127	132	129

(*) Maceração de 1 g/l de placa, durante 24 horas.

(**) Seguindo a curva de colmatagem.

Segundo os dados obtidos, contidos no Quadro 7, pode-se dar a seguinte interpretação:

a) Constatou-se sempre o enriquecimento, em cálcio, quando se ensaiou a maceração. Mas êsse enriquecimento, de modo geral, pode ser julgado como desprezível, sem ser nocivo ao vinho tratado.

b) Em referência à filtração fracionada, assemelha-se muito ao caso anterior, com um pouco menos de enriquecimento. Quando se verifica a média das quatro frações, os dados são ainda mais baixos.

Pode-se concluir, pois, que os tratamentos dessas placas filtrantes, pelos fabricantes, são eficientes.

4. Tratamento do vinho com a bentonita

Atualmente, o emprêgo da bentonita nos tratamentos de vinho branco e de certos vinhos licorosos, em relação à estabilização protéica, é reconhecido e desenvolvido em todos os países vinícolas.

RIBEREAU-GAYON (3) demonstrou que o emprêgo da bentonita constitui o tratamento preventivo mais simples e melhor da "casse" cúprica, tanto mais interessante porque elimina, ao mesmo tempo, as proteínas. A bentonita não elimina o cobre, mas eliminando completamente as proteínas, impede a floculação do colóide cúprico.

As bentonitas são substâncias minerais naturais: são silicatos de alumínio hidratados, compostos principalmente de montmorilonita (Al_2O_3 4 $SiO_2 nH_2O$) (4).

As bentonitas mesmo em meio ácido são carregadas de eletricidade negativa e são precipitadas por cationtes: os iontes hidrogênios provocam, igualmente, a floculação, mas a uma concentração relativamente elevada (4).

Conpreende-se, desta forma, o mecanismo pelo qual a bentonita é floculada no vinho, adsorvendo as proteínas, que são, em meio ácido, carregadas de eletricidade positiva (4).

RIBEREAU-GAYON e PEYNAUD (4) demonstraram nos valores extremos das análises de bentonita de diversos autores, o teor em cálcio 1 a 3,7% entre (expresso em CaO) e, segundo PARONETTO (2), o extremo é um pouco mais elevado, de 0,48 a 6,45%.

Modo de tratamento: Ensaiaram-se oito bentonitas de diferentes origens. Utilizou-se, no tratamento, 1 g de bentonita por litro de vinho. Inicialmente, preparou-se a suspensão de bentonita na água, de acôrdo com a técnica de utilização da bentonita na prática.

Após o tratamento, deixou-se em contacto com o vinho durante 24 horas, sem agitação.

Quadro 8. Tratamento do vinho com bentonita (1 g por litro). Contacto durante 24 horas.

TIPOS DE BENTONITA	Cálcio Vinho testemunha	Cálcio Vinho tratado
	(mg/l	(mg/l
1 - EMO (com carvão)	127	127
2 - Granulado (Bentcoll)	-	130
3 - Rumeno	-	127
4 - Super-clarificante 203 B	-	127
5 - (Sem marca)	-	130
6 - Fundoplast	-	132
7 - PEREZ Collado	-	134
8 - LA ELCHA	-	128

Segundo o quadro 8, pode-se verificar que para três amostras não se registrou enriquecimento em cálcio. Para as outras, que mostraram um enriquecimento, pode-se considerá-lo desprezível.

Pode-se concluir que o emprêgo de bentonitas destinadas a usos enológicos não trará problemas de enriquecimento em cálcio, sob forma nociva.

CONCLUSÃO

Com relação ao meio de eliminação de cálcio do vinho, o melhor tratamento, segundo nossa opinião, será dado pela resina trocadora de cationtes, sobretudo quando a regeneração é mista (Na e Mg). Eliminando-se o excesso de K^+ e Ca^{++} e substituindo-se êstes minerais por Na^+ e Mg^{++}, pode-se tornar o vinho estável em relação à precipitação tartárica.

Para os ensaios realizados com ácido tartárico L, pode-se dizer que a eliminação do cálcio é eficaz, porém, não se solucionou a desacidificação do vinho, porque não o analisamos sob êsse aspecto. Teòricamente, deve-se verificar êste fenômeno. Por outro lado, com o ácido tratárico racêmico, verificou-se também uma eliminação de cálcio, mas menos eficaz que o anterior, para uma mesma dose empregada. Pode-se dizer, teòricamente, que o fenômeno de desacidificação não se deve verificar.

Após a pesquisa das causas do enriquecimento de cálcio com diversos produtos correntemente empregados para tratamento de vinho, verificou-se o seguinte:

a) Quando se utiliza o fitato de cálcio como desferragem, há sempre um enriquecimento de cálcio, variando o seu teor em função da dose de fitato empregado.

b) Com a terra de infusório (diatomáceas) constatou-se que uma amostra, em nove examinadas, enriqueceu-se consideràvelmente em cálcio.

c) Com as placas filtrantes verificou-se igualmente enriquecimento, porém desprezível.

d) Finalmente, com a bentonita também se verificou um enriquecimento, mas que também é desprezível.

LITERATURA

1. GAROGLIO, P.G. La nuova enologia. Instituto di Industrie Agrarie, III edizione (ampliata) , Firenze, 1463, 1965.

2. PARONETTO, L. Ausiliari fisici chimici biologici in enologia. Enostampa Editrice, Verona, 318-319, 1963.

3. RIBEREAU-GAYON, J. & PEYNAUD, E. Analyse et controle des vins. Libr. Ch. Béranger, Paris , 117-191, 1958.

4. _____ & _____. Traité d'Enologie, tome II. Labr. Ch. Béranger, Dunod, Paris, 26, 364, 731, 732, 817, 820, 821, 849, 916, 917.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/70

INIBIÇÃO DE *PSEUDOMONAS PUTREFACIENS* POR *STREPTOCOCCUS DIACETILACTIS* E *LEUCONOSTOC CITROVORUM* (*)

José Sátiro de Oliveira

RESUMO

Diversas amostras de manteiga comercial que apresentavam o defeito de deterioração proteolítica, foram utilizadas para o isolamento de Pseudomonas putrefaciens, *a bactéria responsável pelo referido defeito.*

Em testes realizados com a Ps. putrefaciens, *verificou-se que esta bactéria pode ser inibida por ácidos cítrico e acético em soluções a 2% e pH igual ou menor que 5,5, por sal (NaCl) a 7% em caldo nutritivo e por sôro proveniente de uma cultura em leite desnatado de* Streptococcus diacetilactis *ou de* Leuconostoc citrovorum, *sendo que, neste último caso, a inibição foi observada a qualquer valor de pH abaixo de 8,0.*

A adição de 0,1 a 1,0% da cultura de S. diacetilactis *ou de* L. citrovorum *em manteiga fresca, preparada a partir de creme contendo de* 10^3 *a* 2×10^4 Ps. putrefaciens *por ml, respectivamente, além de melhorar o sabor, preveniu-a do defeito da deterioração proteolítica.*

(*) Adaptado da tese para obtenção de M.S. em Tecnologia de Alimentos, na Universidade de Purdue, Lafayette, Indiana, E.U.A.

SUMMARY

INHIBITION OF PSEUDOMONAS PUTREFACIENS, STREPTOCOCCUS DIACETILACTIS e LEUCONOSTOC CITROVORUM. *Several samples of commercial proteolytic butter were examined for the isolation of* Pseudomonas putrefaciens. *The same organism was also isolated from the floor of a commercial dairy plant and from stagnated water from a roadside ditch.*

Ps. putrefaciens *was inhibited by 2% solution of citric and acetic acid at pH 5,5 or less. The supernatant from skim milk cultures of* Streptococcus diacetilactis *or* Leuconostoc citrovorum *was very effective in inhibiting* Ps. putrefaciens *at any pH value below 8.0. The same organism was also inhibited by 7% salt in nutrient broth culture.*

The addition of 0.1 to 1.0% of skim milk culture of S. diacetilactis *or* L. citrovorum *into fresh salted or unsalted butter prepared from cream inoculated with* Ps. putrefaciens, *besides improving the flavor prevented the proteolytic defect.*

INTRODUÇÃO

A fermentação é um fator muito importante na fabricação de vários produtos de lacticínios. Antes mesmo que a microbiologia fosse conhecida, ela já era empregada no preparo de vários produtos. Com o advento da pasteurização, a fermentação controlada passou, então, a ser fator primordial no preparo de numerosos derivados do leite. Para isso, a matéria-prima (leite, creme, etc.) é pasteurizada para destruição da flora natural, e culturas lácticas, puras ou associadas, são adicionadas com a finalidade de fermentar um ou mais dos componentes do leite, com a produção de ácido e várias outras substâncias responsáveis por sabor e aroma.

Streptococcus diacetilactis e *Leuconostoc citrovorum* são empregados, principalmente como produtores de sabor e aroma, pela fermentação do citrato em diacetil, acetilmetilcabonil ou acetoína e ácidos voláteis (2). Além do citrato, o *S. diacetilactis* fermenta lactose com a produção de ácido láctico, sendo, por isso, muito utilizado, principalmente na Europa, como cultura láctica em vários produtos de laticínios, com a dupla finalidade de produzir acidez e aroma. O emprego dessa cultura, pura ou associada, no preparo da manteiga, com a finalidade de melhorar o sabor e evitar certos defeitos, tem sido indicado por vários autores (4, 5, 7, 10).

Nos países em que a rancificação da manteiga já não mais constitui problema à indústria, um outro defeito muito sério, denominado deterioração proteolítica, tem sido assinalado, o qual é causado por ênzimos proteolíticos produzidos por *Pseudomonas putrefaciens*. Esta bactéria, quando presente na manteiga, produz, mesmo sob condições de refrigeração, a decomposição dos resíduos protéicos, o que resulta em produto com odor e sabor de podre, sem qualquer possibilidade de uso como alimento.

Além de produzirem sabor desejável, às culturas lácticas acima citadas, tem sido assinalado, recentemente, o papel de exercerem uma ação inibidora sôbre várias espécies de bactérias, inclusive algumas espécies de *Pseudomonas*, muito importantes na preservação de alimentos refrigerados (3, 6, 8, 9, 11, 12).

Considerando que muito pouco se sabe a respeito do poder inibitório dessas culturas sôbre a *Ps. putrefaciens*, o objetivo dêste trabalho foi o de pesquisar êsse efeito e a eventual possibilidade do emprêgo das mesmas no preparo da manteiga.

Foram efetuados ensaios em laboratório, com a finalidade de verificar o poder inibitório de *S. diacetilactis* e *L. citrovorum* sôbre diversas culturas de *Ps. putrefaciens*, isoladas para êsse fim de várias

fontes, inclusive de manteiga apresentando a deterioração proteolítica. As mesmas culturas de *Ps. putrefaciens*, após serem testadas em laboratório, foram inoculadas em várias proporções no creme esterilizado ou no pasteurizado, empregados no preparo de manteiga experimental. Esta manteiga foi depois tratada com culturas de *S. diacetilactis* ou *L. citrovorum*, numa tentativa para inibir a *Ps. putrefaciens* e, conseqüentemente, evitar a deterioração proteolítica.

MATERIAIS E MÉTODOS

As culturas utilizadas neste trabalho foram mantidas em meio de leite desnatado e armazenadas a 4ºC, enquanto não eram empregadas. Por ocasião do seu emprêgo, em qualquer ensaio, eram primeiramente ativadas mediante duas repicagens sucessivas e incubadas a 21ºC, durante 24 horas.

O leite e o creme utilizados nos experimentos, eram produtos frescos e de qualidade comprovada para o fim previsto. O leite desnatado empregado como meio de cultura, era prèviamente esterilizado em autoclave a 121ºC, a 15 libras de pressão e durante 15 minutos. O creme a ser processado em manteiga, era tratado em pasteurizador de placas a 82ºC ou em esterilizador de alta temperatura (Cherril-Burrel Spirotherm Sterilizer) a 148,8ºC e durante 1 a 1,4 segundos.

O poder inibitório foi determinado em laboratório, utilizando-se da técnica de antibiograma com discos de papel de filtro. A *Ps. putrefaciens* utilizada no teste era cultivada em placas de Petri contendo o meio glicose-triptona-extrato de levedura-ágar (GTL-Ágar) (12). O *S. diacetilactis* e o *L. citrovorum* eram cultivados em leite desnatado, utilizando-se 1% de inóculo e incubação durante 48 horas a 21ºC. A cultura de *L. citrovorum*, depois de 24 horas de incubação, era acidificada com ácido cítrico esterilizado, a pH 4,3. Isto foi feito, porque o poder inibitório dessa cultura apenas se desenvolve a pH abaixo de

5,0, sendo 4,3 o ideal. Após a incubação e conseqüente coagulação, essas culturas foram centrifugadas a baixa rotação (1.000 a 1.500 r.p.m.) para separação do sôro (líquido sobrenadante) a ser utilizado no teste de inibição. O poder inibitório era medido pelo diâmetro do halo formado na superfície da cultura de *Ps. putrefaciens*.

A determinação da tolerância ao sal foi feita pela adição dêste, até a concentração desejada, em caldo nutritivo, o qual foi esterilizado, inoculado e incubado a 21ºC, durante 48 horas, verificando-se, depois, a presença ou ausência de crescimento.

A determinação de pH foi efetuada com um potenciômetro Fisher equipado com um eléctrodo combinado. O pH das culturas foi determinado diretamente nestas ou no sôro delas extraído e, na manteiga, foi determinado também no sôro, extraído por centrifugação do produto fundido à temperatura de 60ºC.

Fêz-se o preparo da manteiga em laboratório, adicionando-se 500 ml de creme esterilizado ou pasteurizado, de acôrdo com o experimento, em potes de vidro de 950 ml, devidamente esterilizados e que, colocados num agitador, foram agitados até a completa separação da manteiga. Após a separação, o leitelho foi escorrido, os grânulos lavados duas vêzes com água esterilizada, ficando a manteiga pronta para ser utilizada nos experimentos. A manteiga comercial experimental, foi preparada segundo a técnica industrial, sem qualquer outra modificação, exceto a da adição das culturas experimentais.

A verificação da eficiência das culturas de *S. diacetilactis* e *L. citrovorum* em controlar a deterioração proteolítica da manteiga, foi feita pela adição das referidas culturas, em diversas proporções, à manteiga preparada a partir de creme previamente inoculado com *Ps. putrefaciens*. A cultura láctica era adicionada à manteiga já preparada e misturada completamente.

RESULTADOS

a) Efeito inibitório de vários ácidos ajustados a diferentes níveis de pH

Soluções a 2% dos ácidos fosfórico, cítrico, láctico e acético, foram ajustadas a pH de 3,0 a 6,5, com solução concentrada de hidróxido de sódio. Foi verificado o poder inibitório dessas soluções sôbre *Ps. putrefaciens*, e os resultados contidos no Quadro 1 mostram que a inibição varia de acôrdo com o ácido empregado e decresce com o aumento do pH, até desaparecer totalmente. O ácido acético foi o mais eficiente, mostrando inibição até pH 6,0.

Quadro 1. Efeito de vários ácidos a diferentes níveis de pH sôbre a *Ps. putrefaciens*.

pH	ÁCIDOS USADOS			
	Fosfórico	Cítrico	Láctico	Acético
3,0	2,0 *	3,2	3,3	4,5
3,5	1,9	3,1	2,9	4,2
4,0	1,8	3,0	2,4	4,0
4,5	0,0	2,8	1,5	5,0
5,0	0,0	2,6	0,0	3,0
5,5	0,0	2,0	0,0	2,4
6,0	0,0	0,0	0,0	1,7
6,5	0,0	0,0	0,0	0,0

(*) Diâmetro do halo de inibição em cm.

b) Efeito inibitório de *S. diacetilactis* e *L. citrovorum* a diferentes níveis de pH sôbre a *Ps. putrefaciens*

Culturas de *S. diacetilactis* e *L. citrovorum*, após incubação durante 48 horas a 21ºC, foram centrifugadas e os soros resultantes, após ajustados com ácido cítrico ou hidróxido de sódio a pH variando de 4,0 a 8,0, foram utilizados nos testes de inibição em *Ps. putrefaciens*. Os resultados expressos no Quadro 2, mostram que o poder inibitório diminuiu com o aumento do pH e que as referidas culturas lácticas inibem eficientemente a *Ps. putrefaciens*, a qualquer valor de pH abaixo de 8,0.

Quadro 2. Efeito inibitório de *S. diacetilactis* e de *L. citrovorum* em pH de 4,0 a 8,0, sôbre *Ps. putrefaciens*.

pH	Culturas Lácticas	
	S. diacetilactis	*L. citrovorum*
4,0	3,0*	2,6
4,5	2,8	2,2
5,0	2,3	2,1
5,5	2,2	2,1
6,0	2,2	1,9
6,5	2,0	1,7
7,0	1,9	1,6
7,5	1,8	1,5
8,0	1,8	1,5

(*) Diâmetro do halo de inibição em cm.

c) Efeito do *S. diacetilactis* e *L. citrovorum* no contrôle da deterioração proteolítica da manteiga.

Uma vez comprovado, em laboratório, que o *S. diacetilactis* e o *L. citrovorum* inibem *Ps. putrefaciens*, surgiu, então, a possibilidade da aplicação dessas culturas no contrôle da deterioração proteolítica da manteiga. Para isso, vários experimentos foram feitos, empregando-se, inicialmente, creme esterilizado e, em seguida, creme pasteurizado. Imediatamente antes do preparo da manteiga, o creme era inoculado, numa primeira fase do trabalho, com $2x10^4$ *Ps. putrefaciens* por ml. A manteiga assim obtida foi distribuída em porções de 60 g, que foram separadas em dois lotes iguais. Em um deles foram feitos tratamentos com uma cultura de *S. diacetilactis* nas proporções de 0,5, 1,0 e 2,0%; no outro procedeu-se da mesma forma, variando sòmente a cultura empregada, que foi o *L. citrovorum*. Na segunda fase do trabalho, o creme foi inoculado com 10^3 *Ps. putrefaciens* por ml e a manteiga resultante recebeu exatamente os mesmos tratamentos, sendo a única diferença as porcentagens das culturas lácticas empregadas, que neste caso foram 0,1, 0,2 e 0,3%. Os dois lotes de amostras assim obtidos foram armazenados às temperaturas de 7 e 21°C, durante um período de até 3 meses.

As amostras armazenadas a 7°C foram analisadas prèviamente, quanto ao pH e sabor e aos 15, 60 e 90 dias após o armazenamento. Os Quadros 3 e 4 mostram sòmente os resultados obtidos com o *S. diacetilactis*, uma vez que aqueles com o *L. citrovorum* foram pràticamente iguais. Pode-se verificar, pelos resultados, que o pH diminuiu à medida que se aumentava o período de armazenamento, porém, esta diminuição era bem menor quando se empregava uma menor proporção de cultura láctica. Em ambos os casos, a testemunha apresentou a deterioração proteolítica com 15 dias de armazenamento, ao passo que o emprêgo de cultura láctica, nas proporções de 1,0 e 1%, para o primeiro e segundo tratamentos, respectivamente, foi suficiente para evitar o referido defeito durante todo o período de armazenamento

As amostras armazenadas a 21°C também foram submetidas ao mesmo julgamento, porém, o seu tempo de armazenamento foi no máximo de 15 dias, pois, apesar de o defeito ter sido igualmente evitado pelas culturas lácticas, a manteiga tornava-se muito ácida após 15 dias de armazenamento.

Quadro 3. Sabor e pH de manteiga de creme esterilizado contendo $2x10^4$ *Ps. putrefaciens* por ml, e tratada com *S. diacetilactis*.

% de *S. diacetilactis*	Número de dias de armazenamento a 7°C							
	0		15		60		90	
	pH	Sabor	pH	Sabor	pH	Sabor	pH	Sabor
0,0	6,50	ND[1]	6,40	D[2]	-	-	-	-
0,5	6,40	ND	5,80	D	-	-	-	-
1,0	6,30	ND	5,75	ND	5,10	ND	4,85	ND
2,0	6,20	ND	5,44	ND	4,50	ND	4,43	ND

1. ND - Não deteriorado
2. D - Deteriorado

Quadro 4. Sabor e pH de manteiga de creme esterilizado contendo 10^3 *Ps. putrefaciens* por ml, e tratada com *S. diacetilactis*.

% de *S. diacetilactis*	Número de dias de armazenamento a 7°C					
	15		60		90	
	pH	Sabor	pH	Sabor	pH	Sabor
0,0	6,37	D[1]	6,30	D	-	-
0,1	6,15	ND[2]	5,75	ND	5,40	ND
0,2	6,05	ND	5,60	ND	5,28	ND
0,3	5,95	ND	5,58	ND	5,25	ND

1. D - Deteriorado
2. ND - Não deteriorado

d) Contrôle da deterioração proteolítica da manteiga comercial

Foram transformados em manteiga 180 litros de creme pasteurizado, contendo 33% de gordura. Adicionou-se a êste creme, no momento da separação da manteiga, cêrca de $4x10^3$ *Ps. putrefaciens* por ml de creme. À manteiga devidamente preparada e lavada, foi adicionado 1% em pêso de cultura de *S. diacetilactis*, a qual foi muito bem incorporada à massa da manteiga. Foram retiradas duas amostras, antes e depois da adição da cultura láctica, sendo a última dividida em duas partes, a uma das quais se juntaram 2% de sal. As amostras foram armazenadas a 7 e 21ºC durante 15 dias. Os resultados da análise, apresentados no Quadro 5, revelam que no décimo-quinto dia, as testemunhas, em ambas as temperaturas de armazenamento, mostravam-se deterioradas, porém, as amostras tratadas com a cultura de *S. diacetilactis* mostraram-se, nas mesmas condições de armazenamento, com excelente sabor e aroma e nenhuma evidência do defeito. Tanto a manteiga com sal, como aquela sem sal, apresentaram pH mais baixo quando armazenadas a 21ºC, embora a primeira apresentasse valores mais elevados em ambas temperaturas.

Quadro 5. Sabor e pH de manteiga de creme pasteurizado contendo $4x10^3$ *Ps. putrefaciens* por ml e tratada com 1% de *S. diacetilactis*.

Tratamento da manteiga	Armazenamento por 15 dias			
	7°C		21°C	
	pH	Sabor	pH	Sabor
Ps. putrefaciens (testemunha)	6,30	D[1]	6,40	D
Ps. putrefaciens + *S. diacetilactis*	6,10	ND[2]	5,50	ND
Ps. putrefaciens + *S. diacetilactis* + sal	6,20	ND	5,70	ND

[1] D - Deteriorada
[2] ND - Não deteriorada.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Ps. putrefaciens é uma bactéria psicrófila que produz um ênzimo proteolítico muito ativo. Essa bactéria, quando presente em qualquer alimento contendo proteína, poderá produzir alterações. Na manteiga, por exemplo, causa a decomposição dos restos de proteína do leite, que permanecem no produto, apesar das lavagens, ocasionando um defeito muito conhecido na América do Norte, denominado "surface taint", "putrid", ou "proteolytic", o qual pode ser traduzido por deterioração proteolítica.

O isolamento de *Ps. putrefaciens* da manteiga comercial exibindo o defeito é muito difícil. A razão disso ainda não foi devidamente esclarecida; talvez, porque o número de células dessa bactéria na manteiga seja demasiadamente baixo, quando o defeito se torna perceptível. O sal - no caso da manteiga com sal - e a competição de outros microrganismos presentes em maior número, poderão inibir, progressivamente, o crescimento da *Ps. putrefaciens;* neste caso, os ênzimos proteolíticos já elaborados seriam responsáveis pela progressão do defeito.

Várias medidas têm sido tentadas pela indústria, com a finalidade de evitar a deterioração proteolítica, porém, ainda não se chegou a um resultado satisfatório. Sabe-se que a *Ps. putrefaciens* é muito sensível à acidez. Por isso, o emprego de culturas lácticas para fermentar o creme, com a produção principalmente de ácido láctico, foi por algum tempo considerado como condição indispensável à produção de uma manteiga de qualidade. Hoje, porém, essa prática está sendo abandonada em alguns países, visto quea sua eficiência não é tão grande quanto se supunha. Para a acidez ser eficiente, o pH deverá ser abaixo de 4,5, valor êste já considerado demasiado baixo para manteiga.

O *S. diacetilactis* e *L. citrovorum* têm sido apontados como capazes de inibir algumas espécies de

Pseudomonas, inclusive a *Ps. putrefaciens*. O fator responsável por essa inibição não foi ainda identificado. Alguns autores sugeriram que a causa era a acidez. Todavia, neste trabalho, verificou-se que a inibição ocorre em qualquer valor de pH abaixo de 8,0 e aumenta à medida que êste valor diminui.

Como a manteiga fresca, preparada a partir de creme doce, tem um pH ao redor de 6,5, a cultura a ser utilizada para inibir *Ps. putrefaciens* terá de ser eficiente ao redor desse valor. Neste trabalho, comprovou-se que o *S. diacetilactis* ou o *L. citrovorum* satisfaz às condições acima mencionadas, o que resultou na possibilidade do emprêgo das referidas culturas na fabricação de manteiga, com a principal finalidade de evitar a deterioração proteolítica. Para isso, vários experimentos foram realizados, utilizando-se creme esterilizado e inoculado com várias proporções de *Ps. putrefaciens*. Esta manteiga, depois de devidamente lavada, foi bem misturada com diferentes proporções de *S. diacetilactis* ou *L. citrovorum*, cultivados em leite desnatado. As amostras assim preparadas foram armazenadas a 7 e 21ºC, temperaturas estas correspondentes às de um refrigerador comum e de ambiente, respectivamente.

Os resultados mostraram que as adições de 0,1 e 1,0% de qualquer uma das culturas lácticas estudadas, foram suficientes para evitar o aparecimento da deterioração proteolítica em manteiga contendo 700 e 10^4 *Ps. putrefaciens* por grama, respectivamente. A manteiga tratada dessa maneira e armazenada a 21ºC, embora não apresentasse o defeito proteolítico, tornou-se excessivamente ácida e com sabor de diacetil muito pronunciado, após 15 dias. Até o oitavo dia, o sabor era excelente.

As amostras armazenadas a 7ºC apresentaram, após 20 dias, o sabor típico de uma manteiga de boa qualidade, preparada a partir de creme devidamente fermentado. Aos 90 dias, o sabor era excelente, a acidez não era elevada e nenhum sinal de deterioração foi verificado.

As amostras-testemunhas, isto é, contendo apenas *Ps. putrefaciens* e não tratadas com a cultura láctica, apresentaram o defeito em 2 a 4 dias, quando armazenadas a 21ºC, e em 7 a 15 dias, quando a 7ºC.

A maioria dos experimentos foi realizada empregando-se creme esterilizado, porém, mais para o final, creme normalmente pasteurizado foi utilizado até mesmo em escala comercial. Também foi verificada a ação do sal adicionado à manteiga, uma vez que a sua ação inibidora ficou demonstrada neste trabalho. Os resultados indicaram que o método de contrôle, aplicado à manteiga com sal, preparada a partir de creme pasteurizado, apresentou melhores resultados em relação ao sabor e à acidez. Parece que o sal teve uma ação benéfica de diminuir a elevação da acidez, mesmo à temperatura de 21ºC.

Com base nos resultados deste trabalho, pode-se concluir que *S. diacetilactis* e *L. citrovorum* são muito eficientes no contrôle da deterioração proteolítica da manteiga. E, devido à pequena quantidade de cultura necessária, a sua aplicação prática apresenta grandes possibilidades. O *S. diacetilactis* tem maiores possibilidades, não apenas por ter apresentado resultados ligeiramente superiores, mas, também, por ser mais fàcilmente cultivado e mantido em condições industriais.

LITERATURA

1. American Public Health Association, "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" p. 232, 12º Ed., American Public Health Association, New York, N.Y., 1967.

2. BABEL, F.J. e HAMMER, B.W. Journal of Dairy Science Abstract, 27, 79, 1944.

3. ELLIKER, P. R. SANDINE, W. R., HAUSER, B. R. e MOSELEY, W.K. Journal of Dairy Science, 47, 680, 1964.

4. FOSTER, E.M., NELSON, F.E., SPECK, M.L..COETSCH R. N & OLSON, J.C "Dairy Microbiology" p. 431, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J.,1957.

5. HOECKER, W.H. & HAMMER, B. W. Iowa Agricultural Experiment Station, Research Bulletin 290. 1941.

6. LONG, H.F. & HAMMER, B. W. Iowa Agricultural Experiment Station, Research Bulletin, 285, 1941.

7. LUKOVNIKOVA, L. A. & KAPOTINA, Z. A. Dairy Science Abstract, 30, 2408, 1968.

8. MARTH, E.H. e RUSSONG, R. V. Journal of Dairy Science, 46, 1033, 1963.

9. MATHER, D. W. & BABEL, F. J. Journal of Dairy of Science, 42, 1957, 1959.

10. MATUSZEWSKI, I. T., POJANOWSKI, E. J. & SUPINSKA,J. Chemical Abstract, 30, 7614, 1936.

11. PINHEIRO, A. J. R., LISKA, J. & PARMELLEE, C. E. Journal of Dairy Science, 51, 183, 1968.

12. VEDAMUTHU, E.R., HAUSER, B. H., HENNING, D. R.,SANDINE, W.E., ELLIKER, P. R. & DAY, E. A. Proc. XVII International Dairy Congress, Sec. D, 611, 1966.

FATÔRES QUE AFETAM O CRESCIMENTO E A FERMENTAÇÃO MALO-LÁCTICA DE *LEUCONOSTOC CITROVORUM* (*)

Tobias J. B. de Menezes

RESUMO

Os fatôres que influenciam o crescimento, a velocidade de fermentação e a conversão enzímica do Leuconostoc citrovorum *foram estudados.*

O crescimento ótimo foi obtido a 30°C em caldo de TGYE suplementado com suco de tomate, em pH entre 4,5 e 5,4. As velocidades máximas de descarboxilação do malato pelas células em repouso, ocorreram a temperatura mais alta e pH mais baixo. Etanol e SO_2, a 4% (v/v) e 20 p.p.m., respectivamente, tenderam a inibir o crescimento, enquanto que concentrações consideràvelmente mais altas não tiveram influência na velocidade de descarboxilação.

Foi difícil induzir a fermentação malo-láctica em vinhos acabados. Os dados sugeriram que o desenvolvimento celular e a conversão enzímica do ácido málico eram inibidos em alguns vinhos. Uma combinação de baixo pH e etanol pareceu ser responsável por inibição do crescimento. Assim, um vinho com um pH de 3,5 e conteúdo de 6% de etanol, falhou em promover a fermentação.

Enquanto que os vinhos acabados eram muito tóxicos, a fermentação malo-láctica foi induzida, com êxito, em vinhos tintos, mas não em brancos, pela adição da linhagem ML-34, juntamente com o inóculo de levedura.

(*) Tese para obtenção do título " Master of Science", na Cornell University, New York, U.S.A., janeiro de 1970.

SUMMARY

FACTORS AFFECTING THE GROWTH AND MALO-LACTIC FERMENTATION BY LEUCONOSTOC CITROVORUM. *The factors influencing growth, the fermentation rate and the enzymatic conversion of* Leuconostoc citrovorum *ML-34 were studied. Optimal growth was obtained at 30 C. in TGYE broth supplemented with tomato juice at pH 4.5 to 5.4. The maximum rate for the decarboxylation of malate by resting cells occurred at a higher temperature and lower pH. Ethanol and* SO_2 *at 4.0% (v/v) and 20 p.p.m. respectivelly, tended to inhibit growth, while considerably higher levels had no influence upon the rate of decarboxylation.*

The malo-lactic fermentation was difficult to induce in finished wines. The data suggested that both cell growth and the enzymatic conversion of malic acid were inhibited in some wines. A combination of low pH and ethanol appeared responsible for growth inhibition; thus a wine having a pH of 3.5 and an ethanol content of 6% (v/v) failed to undergo the fermentation.

While finished wines were very toxic, the malo-lactic fermentation was successfully induced in red but not white musts by the addition of strain ML-34 along with the yeast inoculum.

INTRODUÇÃO

A fermentação malo-láctica - uma fermentação secundária do vinho - é levada a efeito principalmente pelas bactérias lácticas que convertem o ácido málico em láctico e CO_2. Como o ácido málico - um ácido dicarboxílico - é um dos principais componentes responsáveis pela acidez das uvas, a sua transformação em ácido láctico - um ácido monocarboxílico - resulta em redução da acidez. Outros produtos finais dos organismos malo-lácticos também podem influir no sabor e na qualidade.

Os vinhos produzidos no Nordeste dos Estados Unidos geralmente têm alta acidez, devido às condições climáticas e às variedades de uvas ali cultivadas. Quando a fermentação malo-láctica ocorre espontaneamente, a qualidade desses vinhos é freqüentemente melhorada. Contudo, o fabricante de vinho tem poucas possibilidades de contrôle quando a fermentação é iniciada ou se ela tem lugar. Para obter melhor contrôle, é provável que a inoculação com culturas puras ou certos ajustes nas condições de armazenamento ou do vinho em si sejam requeridos.

A finalidade dêste trabalho foi investigar os fatôres que influem nas condições de crescimento, velocidade da fermentação e conversão enzímica do ácido málico por um organismo malo-láctico. O *Leuconostoc citrovorum* ML-34 foi utilizado neste trabalho, porque foi relatado ser uma das melhores linhagens para a fermentação malo-láctica em vinhos.

REVISÃO DA LITERATURA

As primeiras observações sôbre a desacidificação de vinhos, relatadas por vários investigadores, foram errôneamente associadas à decomposição do tartarato (24). Entretanto, BALLARD (2) reconheceu a formação de ácido láctico em vinhos, e KULISH (23) foi o primeiro a demonstrar que a desacidificação ocorria biològicamente, atribuindo, entretanto, à levedura, como o agente responsável.

As primeiras experiências realizadas para controlar a redução ácida, foram atribuídas a KULISH (23), que pretendeu ter alcançado a desacidificação pela adição de uma cultura pura de *Saccharomyces ellipsoideus*. MULLER-THURGAU (31) foi o primeiro a associar corretamente a presença de bactéria à perda da acidez em vinhos.

A bactéria malo-láctica foi isolada pela primeira vez por KOCH (20), que reconheceu ser o desaparecimento do ácido málico responsável pela desacidificação de vinho. MULLER-THURGAU, que também reconheceu serem as bactérias responsáveis, denominou de *Bacterium gracile* ao seu isolado que decompunha o ácido málico (32). Posteriormente, diversos pesquisadores demonstraram que um grande número de espécies, tôdas da família das *Lactobacillaceae* podem levar a efeito a fermentação malo-láctica. Estas incluem: *Lactobacillus buchneri, L. casei, L. delbrueckii, L. fermenti, L. hilgardii, L. pastorianus, L. plantarum, Leuconostoc citrovorum, L. dextranicum* e *L. mesenteróides* (39); *Lactobacillus brevis* (44); *Lactobacillus leichmannii* (8).

Leuconostoc citrovorum ML-34, o organismo empregado neste trabalho, foi uma das cinco linhagens isoladas por INGRAHAM e outros (18), em vinhos novos da Califórnia. WEBB e INGRAHAM (48), utilizaram ML-34 com êxito, como cultura malo-láctica, inoculando-o em suco de uva sendo fermentado com a levedura Montrachet. KUNKEE e outros (26) descobriram que o ML-34 convertia o ácido málico mais ràpidamente que o ML-30, um *Lactobacillus*, e embora causasse um ligeiro aumento na acidez volátil, o ML-34 não produzia efeito prejudicial nos vinhos. KUNKEE considerou-o ser uma das melhores linhagens como inóculo de vinho, por causa da sua tolerância a baixos valores de pH e temperatura e à produção desprezível de sabores desagradáveis (24). O organismo foi denominado *Leuconostoc citrovorum*, por PILONE e outros (35), que verificaram que êle produzia ácidos láctico e acético da glicose, não fermentava a sacarose e xilose e decompunha o ácido cítrico.

GARVIE (14), que isolou noventa linhagens de *Leuconostoc* de vinho, propôs uma nova espécie, o *Leuconostoc oenos*, devido ao fato de que as linhagens eram capazes de tolerar um pH mais baixo e concentrações mais altas de etanol do que outros cocos heterofermentativos. Colocou o ML-34, bem como outras cepas isoladas por RADLER (37), nesta espécie.

KOCH (20) foi, provàvelmente, o primeiro a reconhecer as exigências nutritivas das bactérias malo-lácticas. Muitos outros pesquisadores assinalaram que êstes organismos comumente crescem muito escassamente na maioria dos meios de cultura de laboratório (14,16, 24).

KUNKEE (24) observou que o *Leuconostoc citrovorum* ML-34 era extremamente "fastidioso". WEBB e INGRAHAM (48) verificaram, também, que o ML-34, crescia escassamente em meio sintético de laboratório. Meios de cultura com suco de tomate para o cultivo de ML-34, foram usados por muitos investigadores (14,18, 24, 48). GARVIE e MABBITT (16) verificaram que é muito difícil cultivar algumas linhagens de *Leuconostoc oenos*, na ausência do suco de tomate e relataram que um fator do suco de tomate era essencial para o crescimento do *L. oenos* NCDO 1974. A substituição do suco de outras plantas, com exclusão do melão, falharam em estimular o crescimento dessa linhagem.

Vários meios foram usados para o cultivo e isolamento da bactéria malo-láctica. GARVIE (14) cultivou *L. oenos* em caldo de tomate acidificado. INGRAHAM utilizou uma modificação do meio de ROGOSA e KUNKEE (24) cultivou o ML-34 em um caldo constituído pelo meio de Rogosa SL (DIFCO) e suco de uva suplementado com 0,05% de extrato de levedura. INGRAHAM e outros (18) empregaram com êxito o ágar extrato de levedura de Fornachon e o ágar suco de tomate e extrato de fígado de Rogosa.

GARVIE (15) estudou o efeito de aminoácidos vitaminas e bases nitrogenadas no crescimento do *Leuconostoc oenos*. Verificou que arginina, cistina, ácido glutâmico, histidina, triptofano, tirosina, riboflavina e ácido fólico eram necessários para tôdas as linhagens. Observou, também, que a adição de cloreto de cisteína ao caldo de extrato de levedura - citrato melhorava o crescimento da maioria das linhagens e era essencial para algumas delas. Entretanto, KUNKEE (24) relatou um crescimento fraco do *Leuconostoc citrovorum*

ML-34 quando cultivado em meio Difco C.F. (*citrovorum* factor assay), suplementado com vários aminoácidos, vitaminas e bases nitrogenadas. A adição dos ácidos málico, cítrico e acético para suplementar o meio não resultou em aumento do crescimento.

ROGOSA e SHARPE (41) verificaram que o crescimento de *Lactobacillus* era estimulado sob uma atmosfera de CO_2. INGRAHAM e outros (18) isolaram uma bactéria malo-láctica em meio incubado em atmosfera rica de CO_2. GARVIE (14) obteve um bom crescimento de *Leuconostoc* de vinho, quando incubado em vaso anaeróbio preenchido por uma mistura de H_2 e CO_2.

BIDAM (4) mostrou que o crescimento da bactéria malo-láctica era favorecido em pH acima de 4,0. O crescimento era retardado entre pH 3,5 a 4,0 e considerável inibição era observada abaixo de 3,5. FORNACHON (11) apontou que o álcool, pH, SO_2 e a duração de tempo que os vinhos eram mantidos nas bôrras parecem ser os principais fatôres influindo na incidência da fermentação malo-láctica. Salientou a importância do pH e observou, numa pesquisa sôbre a incidência da fermentação malo-láctica, que enquanto alguns vinhos haviam desenvolvido a fermentação em pH abaixo de 3,4, muito poucas amostras de pH abaixo de 3,2 eram fermentadas. Uma exceção, contudo, foi uma amostra de vinho tendo um pH de 3,04. POITTEVIN e CARRASCA (36) demonstraram que a decomposição do malato na presença de glicose por *Lactobacillus* homo e heterofermentativos, era mais provável ocorrer em pH 6,8 do que em pH 4,0. Na ausência de glicose, pequena diferença era observada entre os dois valores de pH. No entanto, INGRAHAM e outros (18) verificaram que a maioria das bactérias isoladas de vinhos tinha um pH ótimo em tôrno de 5,5. REYNAUD e DOMERCA (34) estudaram o efeito do pH na fermentação de açucar e a utilização do malato por várias bactérias malo-lácticas. Com cocos heterofermentativos em pH 3,0, nenhum ácido-málico estava presente após várias semanas de incubação. Com *Lactobacillus* homo e heterofermentativos, ocorria um completo desaparecimento do ácido málico em valores mais al-

tos de pH, 3,4 e 4,2 respectivamente. Demonstraram, também, que a complementação da fermentação malo-láctica, em meio inoculado simultâneamente com *Saccharomyces ellipsoideus*, ocorria após 15 dias a pH 3,1 e 3,3, e após 30 dias, a pH 2,9.

As espécies de *Leuconostoc* possuem uma temperatura ótima entre 20 - 25°C (6) GARINO-CANINA (13) expõem que a fermentação malo-láctica pode ocorrer entre 10 a 15°C, sob condições de armazenamento em adegas. BIDAN (4), encontrou temperaturas entre 25 e 32°C, como sendo ótimas para os *Leuconostoc* isolados de vinho, e GARVIE (14) observou que a maioria das linhagens de *Leuconostoc oenos* pode crescer a 37,5°C. Não foi relatada, ainda, a temperatura ótima de crescimento do *Leuconostoc citrovorum* ML-34.

WEBB e INGRAHAM(48) atribuíram a presença de alto conteúdo de álcool, como sendo uma das razões para a falta de êxito em induzir a fermentaçao malo-láctica em vinhos acabados. KUNKEE (24) assinalou que a fermentaçao malo-láctica pode ser retardada, mas não necessàriamente inibida, por uma solução com 10-14%(v/v) de álcool, e que a inibição poderia ser detectada em concentrações de etanol tão baixas quanto 6%.FORNACHON (11) conseguiu induzir a fermentação malo-láctica em vinhos secos com 13,5% (v/v) de etanol por inoculação com *Lactobacillus*. Relatou que a fermentação malo-láctica raramente ocorria espontâneamente nos vinhos fortes australianos. BIDAN (4) verificou que em meio contendo ácido málico como única fonte disponível de carbono, o crescimento de um *Pediococcus* isolado do vinho era inibido por uma solução de etanol a 5,0% (v/v), enquanto que não era detectada inibição de *Leuconostoc* em concentrações acima de 10%. GARVIE (14) também observou que *L. oenos* crescia em álcool a 10% (v/v) depois de 4 dias.

KUNKEE (24) afirmou que a informação sôbre a resistência das bactérias malo-lácticas ao SO_2 é imprecisa, por causa da variedade de formas iônicas na solução. Afirmou que o seu efeito inibidor é devido

à concentração de ácido sulfuroso "livre" que, por sua vez, é dependente do pH e da concentração de aldeídos. Observou um efeito sinergístico entre o pH e a concentração de SO_2, recomendando que a quantidade de SO_2 a ser usada para inibir as bactérias malo-lácticas, deve ser determinada empiricamente (25).

FORNACHON (11) também mostrou o efeito combinado do pH e SO_2 na incidência das fermentações malolácticas em vinhos secos, brancos e tintos. Estudando a resistência das bactérias lácticas isoladas do vinho, ao SO_2 livre e combinado, verificou que *Leuconostoc mesenteroides* era fortemente inibido após 14 dias, por tratamento com 60 p.p.m. (12). Nesse tempo, as concentrações de SO_2 combinado e livre, eram de 16 e 1 p.p.m., respectivamente. Ao contrário da opinião geral, também atribuiu algo do efeito inibidor ao SO_2 combinado.

BIDAN (4) cultivou *Pediococcus* e *Leuconostoc* em meio contendo ácido málico como única fonte de carbono. Entretanto, GARVIE e MABBITT (16) observaram uma supressão no crescimento de *L. oenos* por diversos ácidos orgânicos, incluindo o ácido málico, quando suco de tomate não era presente no meio. Um aumentado efeito inibidor foi encontrado na seguinte ordem: cítrico, tartárico, succínico, málico, maléico, fumárico e pirúvico. Apenas uma ligeira inibição foi observada com o ácido acético. A adição de suco de tomate (5% v/v) superou o efeito inibidor combinado de uma mistura de 0,25 mg/ml cada de ácido cítrico, málico e succínico. RADLER (38) assinalou que os ácidos orgânicos não ocorrem nos vinhos em concentrações inibitórias e que as bactérias malo-lácticas podem ser inibidas por taninos e polifenóis. KUNKEE (24) não obteve aumento na resposta ao crescimento de ML-34, quando ácido L-málico, cítrico ou acético era adicionado para suplementar meio C.F.

A equação geral para a conversão do ácido málico em láctico e CO_2 foi apresentada pela primeira vez em 1901, por MOSLINGER (30) e SEIFER (43). KOR-

KES e UCHOA (22) isolaram um ênzimo do *Lactobacillus arabinosus* (agora chamado *L. plantarum*), que conduzia à conversão do ácido málico em láctico. Uma associação íntima foi encontrada entre êste ênzimo que catalisa a descarboxilação oxidativa do malato em piruvato e CO_2, e a desidrogênase láctica que catalisa a redução do ácido pirúvico em ácido láctico (21). Nicotinamida adenina dinucleótide e Mn^{++} eram requeridos (21, 49). A reação era reversível, embora o equilíbrio fôsse a favor da descarboxilação (21).

JERCHEL e outros (19) estudaram o metabolismo do malato de uma linhagem de *Leuconostoc*, e sugeriram que, além do ênzimo málico, estão envolvidas a desidrogênase málica e a descarboxílase do ácido oxaloacético. RADLER (38) apontou que há possibilidade de que o ácido málico seja também oxidado a ácido oxaloacético.

WHITING e COGGIN (49) encontraram um ênzimo málico induzível em *Leuconostoc mesenteroides*. FLESCH (10) observou que as bactérias lácticas homofermentativas sempre formam um ênzimo induzível, enquanto que as espécies heterofermentativas podem possuir seja o ênzimo induzível como o constitutivo, dependendo das condições de crescimento.

BLANCHARD e outros (5) notaram que linhagens normais de *Lactobacillus arabinosus* requeriam glicose no meio de crescimento para indução, enquanto que biotina também era necessária por linhagens deficientes em biotina. Descobriram que células induzidas continham 50 vêzes mais ênzimo do que as não induzidas.

DEAL e LISCHSTEIN (7) descobriram que as exigências nutricionais para a indução do ênzimo málico e crescimento de *L. arabinosus* são similares. Relataram que a velocidade e o grau de indução enzímica por células em repouso do organismo deficiente em biotina eram estimuladas pela adição de biotina à mistura reativa.

RADLER (38) cultivou *L. arabinosus* em extrato de levedura e observou que a presença de glicose no meio, tinha um efeito estimulante na indução do ênzimo málico. FLESCH (10) cultivou *L. arabinosus* e três outras cepas de *Leuconostoc* no caldo nutriente da DIFCO e não encontrou nenhum efeito da glicose na indução do ênzimo e na velocidade da descarboxilação.

WHITING e COGGIN (49) observaram que com células lavadas de *Leuconostoc mesenteroides* que foram cultivadas em presença de malato, a velocidade máxima de descarboxilação ocorreu em pH 4,0. Entretanto, com células pulverizadas com acetona, a atividade ótima foi observada em pH 6,0. FLESCH (9) descobriu que o pH ótimo para a decomposição do malato, pela maioria das bactérias malo-lácticas estudadas, está em tôrno de 3,9.

FLESCH (10) realizou a decomposição do ácido málico em vinho usando células não reprodutoras em uma concentração de 1 a 4 x 10^9/ml. A decomposição do malato ocorreu sem ajustamento do pH. Foi capaz de colhêr e reusar as células em diversas experiências.

FLESCH (10) estudou o efeito da presença de glicose (0,36%) na mistura reativa, usando células em repouso de bactérias malo-lácticas homo e heterofermentativas. Verificou que a glicólise ativou o metabolismo do malato das linhagens homofermentativas, mas inibiu as heterofermentativas.

RADLER (38) detectou uma inibição da atividade do énzimo málico pelo álcool etílico, usando células em repouso da *Lactobacillus arabinosus*. Uma forte inibição foi encontrada em pH 4,0 a um nível de etanol de 10% (v/v), enquanto que em pH 5,6 pouca inibição era detectada abaixo de 20% (v/v) de etanol. Também estudou o efeito inibidor de SO_2 e verificou que com 8,0 p.p.m. 82% do énzimo málico eram inibidos. Inibição competitiva do énzimo málico detectada quando o ácido D-málico era adicionado à mistura reativa.

A inoculação de cultura pura em mostos e vinhos numa tentativa para induzir a conversão malo-láctica foi relatada por vários pesquisadores (20, 24, 25, 32, 33, 48). WEBB (47) usando uma bactéria isolada do vinho que tinha sofrido a fermentação, descreve a primeira experiência bem sucedida levada a efeito nos Estados Unidos. KUNKEE (24) recomendou um procedimento geral, usando 0,01% a 1% da linhagem ML-34 que havia sido propagada em suco de uva, suplementado com 0,05% do extrato de levedura, ajustado para pH 4,5. Recomendou, também, uma mistura do vinho que havia sofrido a conversão malo-láctica. Afirmou que a fermentação malo-láctica induzida por *Leuconostoc citrovorum* não produzia efeitos colaterais prejudiciais, mas que não deveria ser usada em mosto ou vinho com alto teor em ácido cítrico, pois que a produção de acetoína a partir do ácido cítrico resultaria em sabores desagradáveis (25).

As dificuldades na indução da fermentação malo-láctica em vinhos terminados foram relatadas por muitos pesquisadores (9, 33, 48). WEBB e INGRAHAM (48) explicaram sua falta de êxito em induzir a fermentação malo-láctica, como resultante da alta concentração alcoólica, o esgotamento dos fatôres de crescimento pela levedura e a carência de uma fonte de energia. Embora todos os três fatôres fôssem julgados importantes, apontaram que o efeito do álcool não estava claro, uma vez que foram capazes de induzir a fermentação malo-láctica em mostos com 11% (v/v) de etanol.

KUNKEE e outros (26) obtiveram uma rápida conversão malo-láctica num vinho sêco comparável à velocidade atingida em mosto inoculado antes do fim da fermentação alcoólica. Entretanto, foi empregado grande quantidade de ML-34 como inóculo e nenhum SO_2 foi adicionado.

KUNKEE (25) observou uma conversão mais rápida com ML-34, quando nenhum SO_2 era adicionado. Concluiu que os fatôres inibidores eram a combinação de acidez elevada SO_2 e drástico processo de colagem. Usando

uma quantidade abundante de inóculo, KUNKEE e outros (26) foram capazes de induzir a fermentação malo-láctica num mosto contendo 200 p.p.m. de SO_2. Sugeriram um período mais longo de incubação para compensar o efeito inibidor do SO_2.

KUNKEE (23) observou uma fermentação malo-láctica mais rápida em pH mais alto do que baixo. Uma correlação entre velocidade e pH foi notada em pH acima de 3,5 e inibição foi detectada abaixo dêsse limite. Afirmou,também,que tinha sido difícil obter fermentação malo-láctica em pH aproximando-se de 3,0 (24).

WEBB e INGRAHAM (48) verificaram que um número maior de linhagens isoladas de vinhos causam fermentação malo-láctica em vinhos tintos do que em vinhos brancos. KUNKEE (25) atribuiu as dificuldades de indução da fermentação malo-láctica em vinhos brancos à maior quantidade de SO_2 usada e concentração mais alta de ácidos nas uvas brancas.

Julga-se que a presença da casca de uva favorece a fermentação malo-láctica, tanto nos vinhos tintos como brancos (25). Desde que as uvas brancas são geralmente fermentadas com as cascas, isto pode explicar parcialmente a menor incidência e dificuldade em induzir a fermentação malo-láctica nos vinhos brancos (24).

MATERIAL E MÉTODOS

O microrganismo e sua manutenção. O *Leuconostoc citrovorum* ML-34 foi obtido do Dr. Ralph Kunkee, da Universidade da Califórnia, em Davis.

A cultura-estoque foi armazenada a 4ºC no meio ágar Rogosa (42) modificado, com a seguinte composição:

Básico

Triptona	20 g
Peptona	5 h
Extrato de levedura	5 g
Extrato de fígado	20 g
Glicose	3 g
Lactose	2 g
Ágar	20 g
Suco de tomate	250 ml
Água	750 ml

Culturas-estoques de trabalho em caldo Rogosa eram transferidas a cada 3 dias.

Estudos de crescimento. Para estudos de crescimento foi utilizado caldo de triptona-glicose-extrato de levedura (TBYE), suplementado com 20% (v/v) de suco de tomate. Êsse meio é designado como TTJ-20.

TGYE Básico

Triptona (DIFCO)	5 g
Extrato de levedura	2,5 g
Sais A	5 g
Sais B	5 ml
Glicose	10 g
Água	1.000 ml

Para plaqueamento, 15 g de ágar foram adicionados a êsse meio.

Sais A

K_2HPO_4	50 g
KH_2PO_4	50 g
Água destilada	500 ml

Sais B

$MgSO_4$	20 g
NaCl	1 g
$FeSO_4.4H_2O$	1 g
$MnSO_4.H_2O$	3 g
Água destilada	500 ml

Suco de tomate enlatado isento de preservativo foi clarificado por centrifugação (Centrífuga SERVALL SS-1) durante 20 minutos a cêrca de 20.000 x g. A filtração do sobrenadante através de papel Whatman nº 1 também foi algumas vêzes necessária, a fim de se obter um sôro claro.

Na preparação do caldo TTJ-20, o pH do suco de tomate e do TGYE básico, foi ajustado a 5,0 com NaOH e HCl, respectivamente. O suco de tomate e o TGYE básico foram esterilizados separadamente a 121°C durante 15 minutos. O suco foi adicionado assèpticamente ao meio básico após a esterilização. O pH do ágar TTJ-20 sem ajuste era de 5,5, sendo que o suco foi adicionado ao ágar básico antes da esterilização.

Os estudos de crescimento foram freqüentemente procedidos em tubos de cultura de 16 x 150 mm, contendo 10 ml de caldo. Os tubos foram inoculados com 0,1 ml de uma cultura de caldo de Rogosa de 3 - 5 dias, contendo uma contagem microscópica de 10^7 a 10^8 células/ml. A temperatura padrão de incubação foi 30°C.

Quando as culturas foram incubadas em atmosfera de CO_2, utilizou-se gêlo sêco como fonte de CO_2. O CO_2 foi introduzido num jarro anaeróbio, no qual foi criada uma pressão negativa por meio de uma bomba d'água. Para assegurar-se de uma atmosfera concentrada de CO_2, o primeiro volume de gás foi liberado, o vácuo refeito e o CO_2 novamente introduzido, até que a pressão interna do jarro estivesse em equilíbrio com a pressão atmosférica.

Enumeração. Contagens diretas ao microscópio (DMC) foram obtidas pela contagem de células numa câmara de Pettroff-Hausser, sob um aumento de 400 vêzes.

Para a maioria dos estudos sôbre velocidade de crescimento, a concentração das células foi medida turbidomàtricamente usando-se três tubos para cada amostra. A densidade óptica (DO) foi lida num espectrofotômetro "Spectronic 20" (Bausch & Lomb) a 660 mμ. A relação entre a densidade óptica e o número das células, determinada segundo a contagem direta ao microscópio, pode-se ver na Figura 1. O número de gerações (n) foi calculado usando-se a seguinte equação:

$$n = \frac{\log b - \log B}{\log 2}$$

log b = DO no tempo t Log B = DO no tempo zero

O tempo de geração (g) foi então calculado pela fórmula g. t/n.

Estudos com células em repouso. Para a produção das culturas de células, o ML-34 foi desenvolvido em um litro de caldo de TGYE contendo 20% (v/v) de suco de uva (TGJ-20). O suco de uva foi primeiramente clarificado numa centrífuga Servall SS-3 a cêrca de 10.000 r.p.m. A adição de suco ao meio básico resultou num pH final em tôrno de 5,5. O caldo foi esterilizado a 121°C, durante 20 minutos.

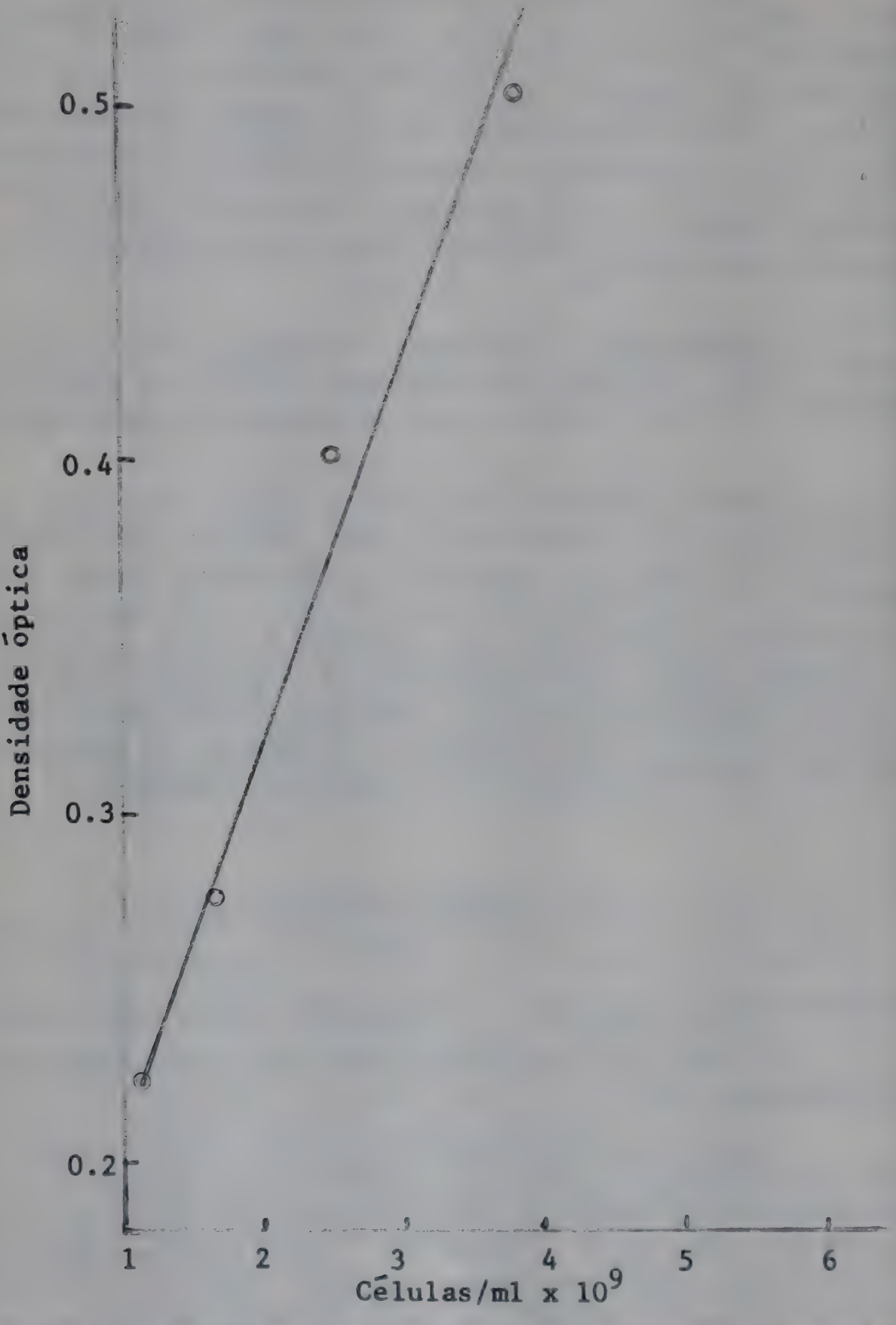


Figura 1. Número de células x densidade óptica a 600 mμ.

Cinco a dez ml de uma cultura de caldo de Rogosa de 3 a 5 dias de idade serviram como inóculo. Após a inoculação, o caldo TGJ-20 foi incubado por 3 a 4 dias a 30°C. As células foram colhidas por centrifugação a 6.000 r.p.m. durante 20 minutos numa centrífuga Servall SS-3. A massa celular foi ressuspensa em cêrca de 100 ml de água destilada e, após uma segunda centrifugação, as células foram suspensas na solução desejada.

As células foram enumeradas pela contagem de diluições apropriadas numa câmara de Petroff-Hausser ou por semeadura em placas com ágar TTJ-20 a 30°C durante 6 dias.

Mistura reativa. Foi utilizada uma solução contendo de 2 a 5 g/ℓ de ácido L-málico e 0,3958 g/ℓ de $MnI2.4H_2O$ (0,002M) como mistura reativa para a maioria dos experimentos. Dez ml da mistura reativa foram pipetados em cada um dos 3 tubos de ensaios de 22 x 175 m, que foram aquecidos a 121°C durante 5 minutos.

Antes da adição das células, os tubos foram aquecidos em um banho-maria, à temperatura de experimento, geralmente 37°C, a fim de obter uma temperatura de equilíbrio. Foram adicionados 10 ml das células lavadas à cada tubo contendo 10 ml de mistura. A concentração final de células variou de 1 a 4 x 10^9 por ml. As suspensões de células foram misturadas num misturador Vortex, antes da incubação em banho-maria a 37°C.

Amostragem. As amostras foram tomadas periòdicamente durante um período de incubação de 20 horas. Os tubos foram agitados em um misturador do tipo "Vortex", antes da remoção de 1 ml dos diferentes tubos de reação.

Imediatamente após a coleta, os tubos contendo as amostras foram aquecidas em água fervente, durante 5 minutos e, então, submersos numa mistura de álcool e gêlo sêco, para prevenir reações posteriores. As amostras foram armazenadas congeladas a -10°C, até que as análises químicas pudessem ser feitas.

Ácido málico. Foi utilizado um procedimento enzímico (28) para determinar o ácido málico. O princípio geral baseia-se na ação da desidrogênase málica (DMH) que catalisa a oxidação de L (-) malato e a redução de nicotinamida adenina dinucleótide (NAD+), de acôrdo com a equação seguinte:

$$\text{L(-) malato} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{oxalacetato} + NADH+H^+$$

A quantidade de NAD reduzido, determinada em um espectrofotômetro Beckman DU, era proporcional ao teor de ácido málico. O método usado foi o de MAYER e BUSCH (28), adaptado para vinho. Os reagentes e suas respectivas origens estão abaixo relacionados:

1. Desidrogênase málica (Calbiochem, Grade A), de coração de porco em $(NH_4)\ 2SO_4$ 2,8 M, atividade 8,700 IU/ml.0,1 ml foi diluído a 1 ml.

2. NAD^+ (Calbiochem, Grade A) solução estoque: 400 mg em 10 ml de água destilada.

3. Hidrazina - Estman Organic Chemicals.

4. Glicina - Estman Organic Chemicals.

As soluções foram armazenadas a 4°C. As amostras foram diluídas de 1:50 a 1:200, para que o teor de ácido málico ficasse na faixa de 1 a 13 µg/ml (3 a 40 µg por cuveta).

O ácido láctico foi determinado por processo colorimétrico de Barker e Summerson (3).

Análises do vinho. Os ácidos málico e láctico também foram determinados qualitativamente pelo método cromatográfico de LUGG e OVERELL (27). O etanol foi determinado por análise ebuliométrica, usando um ebulioscópio de Dujardin - Salleron (1). A acidez total foi determinada pelo método de Guymon e Ough, como descrito por AMERINE (1). Um potenciômetro Beckman Zeromatic, foi usado para determinar a concentração do

ionte hidrogênio. O dióxido de enxôfre foi determinado pelo método de AMERINE (1). Um refratômetro de mão foi usado para determinar a porcentagem de açúcar (Brix).

RESULTADOS

Neste estudo, o crescimento foi estudado separadamente da conversão enzímica do ácido málico pelas células em repouso, na suposição de que ambos poderiam ser afetados diferentemente. Por exemplo, uma determinada concentração de etanol pode inibir o crescimento, mas não ter detectável efeito sôbre o enzimo málico. Reciprocamente, as condições que são ótimas para o enzimo, podem não proporcionar condições para uma multiplicação mais rápida das células ou produções mais altas.

Estudos de crescimento

Como poderia ser esperado, foram obtidos dados indicando que uma certa concentração de células era requerida para produzir uma redução detectável no teor de ácido málico. Em um ensaio realizado com células em crescimento não foi observada diminuição na concentração do ácido málico, até que a densidade óptica alcançasse um valor em tôrno de 0,1, correspondente a uma população de células acima de 10^8/ml (Fig. 2). Pode-se ver que um período de incubação de 4 dias a 30°C, foi requerido para atingir o necessário nível de células. Os ensaios com células em repouso também mostraram que o desdobramento das quantidades significativas de malato requeria uma determinada concentração celular. O quadro 1 mostra que pequeno desaparecimento de ácido málico ocorria durante um período de incubação de 20 horas, quando as concentrações de ML-34 eram inferiores a 10^8 células/ml.

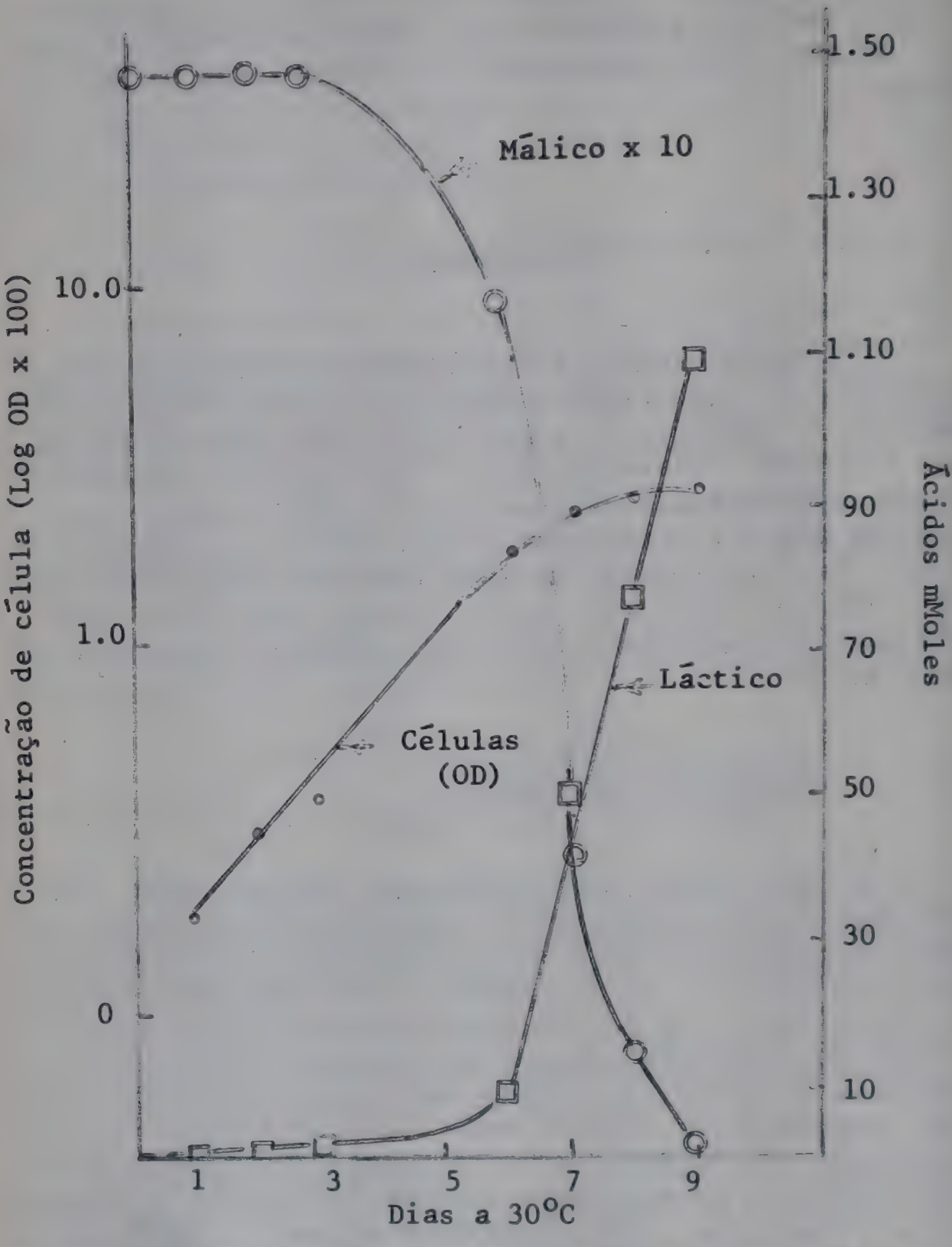


Figura 2. Modificações na população celular e ácidos orgânicos no caldo TTJ-20.

O TTJ-20 foi suplementado com DL-ácido málico para fornecer um conteúdo inicial de 0,15 milimoles de ácido L-málico.

Quadro 1. Efeito da concentração de células em repouso sôbre a conversão enzímica do ácido málico.

Células/ml	Ácido L-málico, em g/ℓ	
	Inicial	Após 20 horas a 37°C
2×10^5	5,57	4,72
2×10^6	5,12	4,72
2×10^7	5,21	4,11
2×10^8	5,86	2,60
2×10^9	4,48	0,25

Mistura reativa: ácido málico, $MnCl_2$ 0,002 M, pH 4,5. Temperatura de incubação = 37°C.

A Figura 2 mostra que a quantidade de ácido láctico produzida no caldo TTJ-20 era consideràvelmente maior do que poderia ser avaliada pela quantidade de ácido málico presente. Se a conversão completa tivesse lugar, o nível inicial de ácido málico de 0,15 milimoles deveria produzir, teòricamente, 0,15 milimoles de ácido láctico. Desde que 1,10 milimoles de lactato foram formados, o excesso de cêrca de 0,95 milimoles poderia ter sido produzido pelos carboidratos presentes no caldo.

Nutrição. As bactérias malo-lácticas são muito fastidiosas com relação às suas exigências de crescimento. Muitos meios comuns de laboratório, incluindo o caldo de *Leuconostoc* (17) falharam em promover o crescimento de ML-34.

O efeito de CO_2 e do suco de tomate no crescimento foi estudado em um grande número de ensaios, depois que STAMER (comunicação pessoal) observou que a multiplicação das células era estimulada por estas

substâncias. O Quadro 2 mostra o efeito de CO_2 e do suco de tomate na contagem de colônias. Neste estudo diluições apropriadas de uma cultura foram plaqueadas em três meios diferentes: Rogosa, TGYE + 2% de suco de tomate e TGYE apenas. Uma boa concordância foi obtida entre o ágar de Rogosa e a contagem direta ao microscópio, indicando que êsse meio permite o crescimento da maioria das células. Os dados também mostram que embora o CO_2 não aumentasse a contagem no ágar de Rogosa, que contém cêrca de 25% (v/v) de suco de tomate, foi necessário, nos outros dois meios, para a formação de colônias visíveis.

Quadro 2. Efeito do suco de tomate e do CO_2 na contagem de colônias.

Atmosfera	Contagem média/ml x 10^9	
	CO_2	Ar
Rogosa (25% de suco de tomate)	1,8	1,8
TGYE + 2% de suco de tomate	1,3	Não houve crescimento
TGYE	0,98	Não houve crescimento

Inóculo - Cultura de caldo de Rogosa de 5 dias contendo 1,9 x 10^9 células/ml (contagem direta ao microscópio).
Incubação = 6 dias a 25°C.

O aumento do crescimento pelo CO_2 também foi obtido quando o ML-34 era cultivado em meio líquido (Quadro 2). O maior estímulo parece ter ocorrido quando uma mistura de glicose e frutose serviu como fonte de carbono. Deve-se assinalar entretanto, que os dados representam os resultados de um único experimento e, assim podem refletir variação experimental em vez de uma interação entre o CO_2 e o açúcar fermentescível.

Várias porções de suco de tomate foram adicionadas ao caldo TGYE com a finalidade de se determinar a concentração que ocasionava o mais rápido crescimento. Embora 50% (v/v) do suco de tomate parecessem ser os mais próximos do ótimo, bom crescimento foi também alcançado com suco a 20% (Quadro 4). Esta concentração foi selecionada para a maioria dos trabalhos, porque parece ser razoável empregar um meio contendo menores quantidades de componentes desconhecidos.

Quadro 3. Efeito do CO_2 no crescimento em caldo.

Fonte de carbono[a]	Crescimento (DO)[b]	
	Ar	CO_2
Frutose, 0,5%, glicose 0,5%	0,48	0,96
Frutose, 1%	0,17	0,79

a - Meio básico: Triptona, 0,5%; Extrato de levedura, 0,25%.
b - Depois de 6 dias a 30°C.

Quadro 4. Efeito da concentração de suco de tomate no caldo TGYE sôbre o crescimento.

Concentração de suco de tomate	Crescimento[a]	Crescimento relativo(%)
0	0,02	3,2
2	0,03	4,8
4	0,04	6,5
8	0,06	9,7
10	0,06	9,7
20	0,17	27,3
50	0,62	100
100	0,27	43,5

a- Meio básico TGYE, pH 6,8; DO depois de 92 horas de incubação a 25°C.

O efeito da esterilização pelo calor na promoção de crescimento pelo suco de tomate, foi investigado pelo cultivo de ML-34 em meio esterilizado, da seguinte forma: (1) TGYE e suco de tomate autoclavados juntos:(2) TGYE e suco de tomate autoclavados separadamente; e (3) TGYE autoclavado, mais a adição de suco de tomate esterilizado por filtração. Os resultados dos tubos em triplicata sugeriram (Quadro 5) que o melhor crescimento foi obtido quando o TGYE e o suco de tomate eram autoclavados separadamente. Entretanto, os dados são difíceis de ser interpretados, pois que quando o suco de tomate foi esterilizado separadamente por filtração, o crescimento não era melhor do que o obtido, quando os dois compostos foram autoclavados juntos.

Quadro 5. Efeito do procedimento da esterilização no crescimento em meio líquido da TGYE - suco de tomate.

Procedimento de esterilização	Tempo de geração média (em horas)	Crescimento após 97 horas (DO)		
		Cultura 1	Cultura 2	Cultura 3
TGYE e suco de tomate autoclavados juntos	22	0,47	0,39	0,66
TGYE e suco de tomate autoclavados separadamente	14	0,91	0,85	0,74
TGYE autoclavado, e suco filtrado	23	0,29	0,47	0,70

Temperatura de incubação : 30°C; pH 4,9.

Uma diferença de pH não era o motivo, pois que todos os três meios tinham um pH de 4,9 no momento da inoculação. Supondo que êsses resultados poderiam ser repetidos, uma explicação possível seria que a autoclavagem do suco de tomate libera ou gera certas substâncias estimuladoras de crescimento, que não são

formadas quando o suco é aquecido no meio básico. Uma outra possibilidade é que o aquecimento do suco de tomate no meio básico também produz substâncias inibidoras do crescimento, que anulam o efeito das estimuladoras de crescimento que haviam sido geradas.

Embora o caldo de Rogosa contenha 25% de suco de tomate (v/v, o crescimento nesse meio ainda pareceu ser estimulado pelo extrato de fígado (Quadro 6). Pode-se ver que o crescimento total, determinado pela densidade óptica, era maior no caldo contendo o extrato de fígado. O cálculo da taxa de crescimento, no entanto, mostrou uma pequena diferença entre os dois meios. Seria possível, portanto, que as diferenças no crescimento total refletissem uma abreviação da fase de latência pelo extrato de fígado.

Quadro 6. Efeito do extrato de fígado no crescimento em caldo de Rogosa.

Idade da cultura (h)	Crescimento total (DO)	
	Com fígado	Sem fígado
81	0,26	0,18
91	0,32	0,23
94	0,38	0,27
115	0,74	0,64

Temperatura de incubação: 26°C.

Verificou-se que outro suco que promoveu o crescimento do ML-34, foi o de uva. Como mostra o Quadro 7, uma concentração de células de cêrca de 2 x 10^8 ml, era atingida em cinco dias, quando suco de Concord de Brix 10° servia como meio de cultura. Contudo, o crescimento parecia ser inferior ao otbido com suco puro de tomate. Assim, com suco de tomate a DO

depois de 92 horas de incubação era de 0,27, o que corresponde a um valor acima de 10^9 células/ml (Quadro 4). Pode-se ver que com o suco de uva, foi necessário um período de incubação de 10 dias para alcançar essa população celular. Parecia que o pH 3,8 do suco do uva é demasiado baixo para favorecer um crescimento acelerado, comparável ao obtido com o suco de tomate.

Quadro 7. Crescimento do ML-34 em suco de uva "Concord".

Dias depois da incubação	Células/ml
5	$2,3 \times 10^8$
6	$5,6 \times 10^8$
7	$9,0 \times 10^8$
8	$9,0 \times 10^8$
10	$1,06 \times 10^9$

Meio: suco de uva "Concord"; pH = 3,8; Brix = 10°.
Temperatura de incubação = 25°C.

O suco de uva "Concord" também poderia substituir com êxito o suco de tomate, como suplemento no caldo TGYE. Os resultados de numerosos ensaios mostraram que boas produções de células podiam ser obtidas quando o suco de uva era adicionado para dar uma concentração final de 20% (Quadro 8).

Quadro 8. Rendimentos celulares no caldo TGJ-20.

Ensaio	DMC células/ml
1	$1,0 \times 10^9$
2	$1,4 \times 10^9$
3	$8,0 \times 10^8$
4	$1,5 \times 10^9$

Incubação : 4 dias a 30°C.

Poderia parecer que os açúcares comuns e os ácidos orgânicos presentes no suco de uva não fôssem responsáveis pelo seu efeito estimulante. Assim, o uso de glicose e frutose no caldo (Quadro 9), não resultou em crescimento particularmente bom quando as culturas eram incubadas em ar livre. Pode-se ver que os ácidos tartárico, málico e cítrico, todos componentes do suco de uva, também falharam em estimular o crescimento. O fraco crescimento obtido quando pentoses perfaziam o grosso do carbono, indica que o ML-34 não fermenta êsses açúcares.

Quadro 9. Efeito da fonte de carbono no crescimento total.

Fonte de carbono	DO médio após 6 dias		
	g/ℓ	Atmosfera CO_2	Ar
Frutose	1	0,15	0,13
Xilose	4,5		
Arabinose	4,5		
Frutose	5,0	0,96	0,48
Glicose	5,0		
Frutose	10,0	0,79	0,17
Frutose	5,0		
Glicose	5,0		
Ácido cítrico	0,3	0,96	0,43
Ácido málico	0,2		
Ácido tartárico	0,5		

Meio básico: Triptona 0,5%;
Extrato de levedura 0,25%;
pH = 5,0; Temperatura de incubação = 30°C.

pH. O efeito do pH no crescimento foi estudado ajustando-se a reação do caldo TTJ-20 com ácido clorídrico ou com hidróxido de sódio. Os resultados (Quadro 10), indicaram que o ótimo pH, tanto para o

crescimento total, como para a taxa de crescimento, era algo entre 4,5 e 5,4. O crescimento era muito vagaroso em pH 3,6, que é uma reação comum de suco de uva e vinhos.

Quadro 10. Efeito do pH no tempo de geração e no crescimento total em meio TTJ-20.

pH [a]	Tempo de geração	DO depois de 90 horas
	h	
3,6	91	0,12
4,2	11	0,96
4,5	8	1,15
5,0	8	1,30
5,4	10	1,22
5,7	15	0,92
6,2	62	0,22

a = leituras de pH após a esterilização e a adição de suco de tomate.
Temperatura de incubação: 25°C.

Além das substâncias promotoras do crescimento, esta pesquisa também considerou os compostos que podiam inibir o ML-34. Aqueles que receberam atenção especial, eram os que são naturalmente presentes ou freqüentemente adicionados ao suco de uva e vinhos.

Etanol. O efeito do etanol no crescimento foi estudado pela adição de diferentes quantidades ao caldo TTJ-20. Os resultados (Quadro 11) mostraram que o crescimento era inibido até mesmo na baixa concentração de etanol de 4%. Em concentrações iguais ou superiores a 10%, pouco ou nenhum crescimento foi alcançado em 93 horas.

Quadro 11. Efeito da concentração de etanol no tempo de geração e crescimento total no caldo TTJ-20.

% Etanol (v/v) [a]	Tempo de geração h	DO após 93 horas
0	9	1,22
2	9	1,22
4	16	0,58
8	28	0,08
10	- - [b]	0,07
20	- - [b]	0,00
30	- - [b]	0,00

[a] O etanol adicionado ao caldo TTJ-20, assèpticamente, após esterilização; pH = 5,0.
Temperatura de incubação: 27°C.
[b] Crescimento pequeno ou não visível.

SO_2. A adição SO_2 aos mostos e vinhos é uma prática comumente levada a efeito nas fábricas de vinho para inibir o crescimento de bactérias e, conseqüentemente, para evitar a deterioração do vinho. Estudos relativos aos defeitos de diferentes concentrações, indicaram que 20 p.p.m. são suficientes para inibir o crescimento e que êste era completamente suprimido pela adição de 50 p.p.m.(Quadro 12). Esperava-se que a concentração de SO_2 livre fôsse consideràvelmente menor do que a indicada, porque uma quantidade significativa se combinaria com vários componentes do meio.

Quadro 12. Efeito do SO_2 no tempo de geração e crescimento total, em caldo TTJ-20.

SO_2 em p.p.m.[a]	Tempo de geração h	OD após 92 horas
0	8	1,30
5	8	1,30
10	7	1,30
20	20	0,70
50	Sem crescimento	0,0
70	Sem crescimento	0,0
100	Sem crescimento	0,0

[a] SO_2 adicionado de uma solução estoque de bissulfito a 0,016%, depois da esterilização.

Ácido málico. Outra substância que se verificou inibir o crescimento de ML-34, foi o ácido málico (Quadro 13).

Quadro 13. Efeito dos ácidos L-málico e DL-málico, no tempo de geração e crescimento total.

% ácido málico total[a]	Tempo de geração h		DO após 99 horas	
0,0	DL	L	DL	L
0,0	10	15	1,00	0,77
0,05	13	18	0,96	0,82
0,10	13	30	0,96	0,59
0,20	26	48	0,48	0,21
0,30	47	98	0,31	0,16
0,40	46	200	0,31	0,11
0,50	53	Sem		
0,50	53	crescimento	0,16	0,00

[a] Solução estoque de ácido málico a 10% foi esterilizada por filtração e adicionada ao caldo TTJ-20, depois de sua esterilização, pH final = 5,5.

Os resultados indicaram que o ácido L-málico é duas vêzes mais inibidor do que ácido DL-málico. Depois de 99 horas de incubação, a DO da cultura contendo 0,2% de ácido málico, era de 0,48 para o DL-málico e apenas 0,21 para o L-málico. Isso sugere que o isômero L-ácido málico era responsável pelo efeito inibidor, pois que o pH de 5,5 era o mesmo para tôdas as culturas.

Os dados de outro ensaio em que o ácido DL-málico era adicionado ao caldo básico de TGYE, também mostrou o efeito inibidor. Depois de 7 dias de incubação, 89% do crescimento total eram inibidos por uma concentração de 0,2% dêste ácido.

Temperatura. A literatura menciona que uma das características do ML-34 é a sua capacidade para crescer a temperaturas relativamente baixas. Estudos sôbre o efeito da temperatura de incubação no crescimento, mostraram que 30°C foi o valor ótimo e que o tempo de geração era maior a 17 do que a 36°C. (Quadro 14). Pode-se ver que um crescimento muito lento ocorria a 10°C, a temperatura mais baixa usada neste estudo.

Quadro 14. Efeito da temperatura no tempo de geração e crescimento total no caldo TTJ-20.

Temperatura °C	Tempo de geração h	DO após 120 horas
10	--a	0,0[b]
17	--a	0,0
22	48	0,33
25	21	0,96
27	21	0,92
30	17	1,04
36	42	0,02

a = Crescimento pequeno ou não visível.

b = DO = 0,20 obtido após 50 dias de incubação.

Células em repouso. Êstes estudos foram realizados, porque parecia ser provável que algumas das condições que inibiam ou estimulavam o crescimento, poderiam ter um efeito diferente sôbre os sistemas de ênzimos responsáveis pela fermentação malo-láctica. A determinação das condições ótimas para a transformação malo-láctica pelas células em repouso, era importante para considerações práticas em que um procedimento poderia ser desenvolvido para que os vinhos pudessem ser tratados com suspensões concentradas de células que haviam sido propagadas em outros meio.

O efeito da concentração das células em repouso na velocidade da fermentação malo-láctica foi estudado pela incubação de diferentes diluições de células obtidas de uma determinada cultura líquida. Os resultados (Figura 3) mostram que uma concentração abaixo de 10^8/ml convertia pequena quantidade de ácido málico durante as 5 horas de incubação. A modificação no declive observada na maioria das suspensões concentradas de células era típica para os ensaios de células em repouso. Portanto, as velocidades de reação foram geralmente calculadas baseando-se nas mudanças ocorridas durante os primeiros 60 minutos de incubação. Um método comum de expressar a velocidade de reação foi na base do tempo exigido para o esgotamento de 90% do ácido málico. Isto foi calculado de acôrdo com a fórmula ... $\frac{t}{\log C_1 - \log C_2}$, onde t = horas de incubação, C_1 a concentração inicial do ácido málico e C_2 a concentração do ácido málico após o tempo t. O tempo de redução de 90% para a suspensão contendo 2×10^9 células/ml (Figura 3) foi calculado ser de 4,4 horas.

O quadro 15 resume os resultados de um número de ensaios nos quais as condições experimentais foram similares, com exceção da concentração celular. Embora fôsse observada uma considerável variação nas velocidades, nota-se que as concentrações de células acima de 10^9/ml, geralmente foram capazes de transformar 90% do ácido málico dentro de 5 horas. Entretanto, certos

ensaios deram tempos consideràvelmente diferentes dêste. O tempo mais longo de redução observado no ensaio nº 4, por exemplo, indica que fatôres desconhecidos influenciaram na velocidade de descarboxilação do malato.

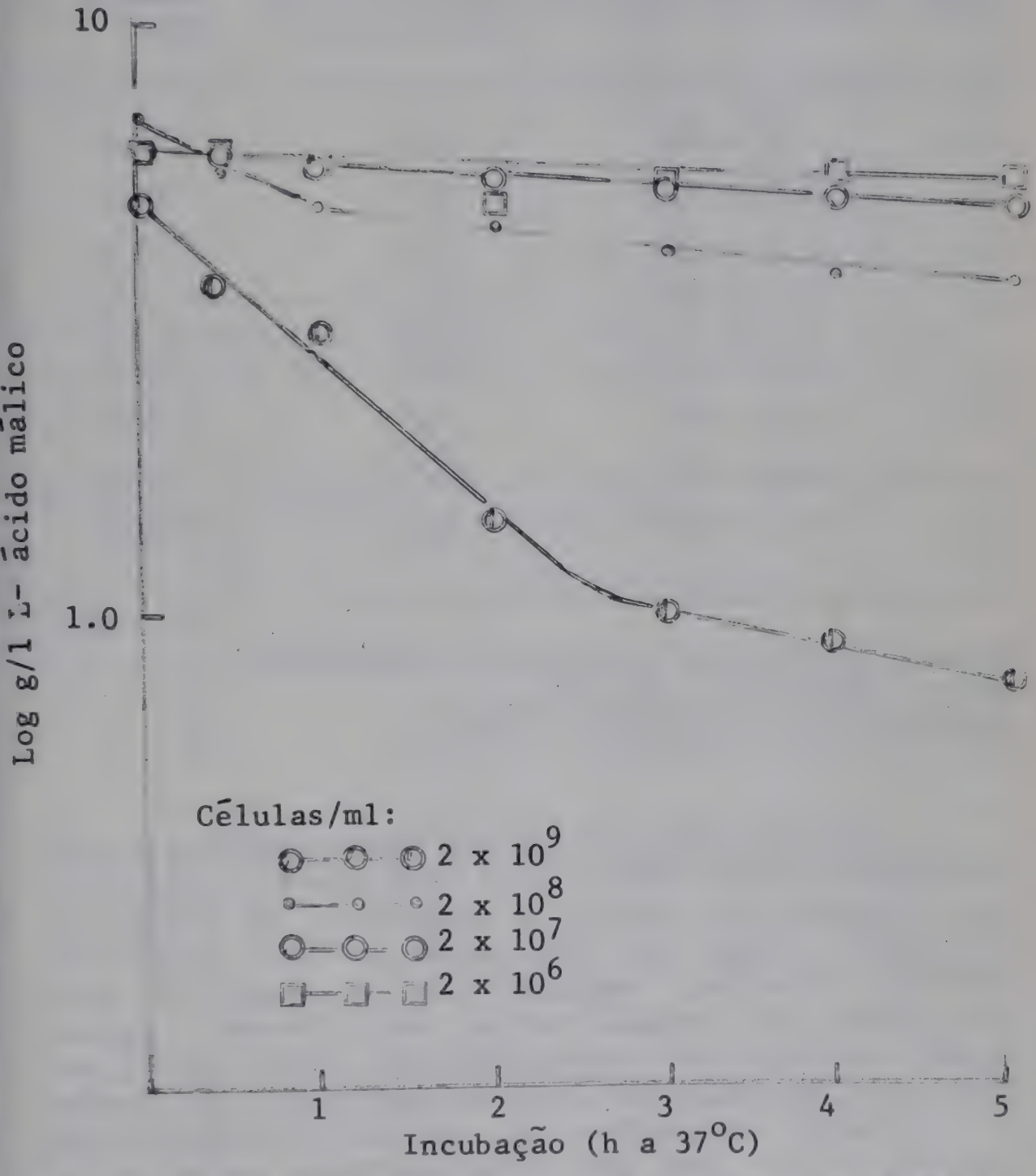


Figura 3. Efeitos da concentração celular do ML-34 na conversão enzímica malo-láctica.
Mistura reativa: ácido málico 5 g/ℓ; $MnCL_2$ 0,002M. pH 4,5. Temperatura de incubação: 37°C.

Quadro 15. Efeito da concentração celular na velocidade de descarboxilação do malato.

Ensaio	Número de células	Ácido L-málico inicial (g/ℓ)	Redução de 90 % h
1	$3,0 \times 10^7$	5,0	50,0
2	$3,0 \times 10^8$	5,0	10,0
3	$2,0 \times 10^9$	5,0	3,3
4	$2,2 \times 10^9$	5,0	8,3
5	$3,0 \times 10^9$	3,0	1,2
6	$5,0 \times 10^9$	5,0	5,5
7	$6,0 \times 10^9$	2,5	2,9
8	$2,4 \times 10^{10}$	2,5	2,2

Mistura reativa: ácido málico, 2,5-5,0 g/ℓ;
$MnCl_2$ 0,002 M; pH 4,5± 0,5;
Temperatura de incubação: 37°C.

Glicose. Quatro ensaios foram realizados para investigar o efeito da glicose no metabolismo do malato. O Quadro 16 mostra a supressão da velocidade de reação quando foi adicionado 1,0 g/ℓ de glicose à mistura reativa, enquanto que o Quadro 17 mostra efeito não significativo da glicose. Apesar do fato de que os resultados dos dois outros ensaios se assemelharem àqueles mostrados no Quadro 17, o efeito da glicose não foi definitivamente conclusivo, visto que uma forte supressão da velocidade de descarboxilação era muito aparente na primeira experiência (Quadro 16).

Quadro 16. Efeito da glicose na velocidade de descarboxilação do malato.

Glicose (g/ℓ)	pH	Incubação (h)	Ácido L-málico em g/ℓ 0	2	4	6	20
1	3,3		2,22	1,03	0,43	0,21	0,06
0			2,23	0,08	0,03	0,05	0,04
1	4,2		2,47	0,32	0,08	0,05	0
0			2,34	0,17	0,04	0,05	0
1	5,4		2,22	1,60	1,00	0,67	0,20
0			2,22	0,85	0,44	0,26	0,21

Mistura reativa: Ácido málico; $MnCl_2$ 0,002M; glicose 1 g/ℓ; células 2,4 x 10^{10}/ml. Temperatura de incubação = 37°C.

Quadro 17. Repetição da experiência. Efeito da glicose na velocidade de decomposição do malato.

Glicose (g/ℓ)	pH	Incubação(h)	Ácido L-málico em g/ℓ 0	0,5	1,0	1,5	2	5	20
1	3,3		1,76	1,35	0,84	0,60	0,46	0,12	0,05
0			1,76	1,21	0,81	0,63	0,05	0,05	0,06
1	4,3		1,83	1,27	1,12	0,82	0,74	0,31	0,05
0			2,02	1,35	1,16	0,84	0,71	0,35	0,13
1	6,0		1,86	1,61	1,62	1,31	1,24	0,19	1,02
0			2,02	1,65	1,62	1,29	1,28	1,20	1,06

Mistura reativa: ácido málico 2,5 g/ℓ; $MnCl_2$ 0,002 M, glicose 1g/ℓ; células 2 x 10^9/ml. Temperatura de incubação: 37°C.

pH. O efeito do pH foi estudado ajustando-se o pH de uma solução estoque de ácido málico com hidróxido de sódio. Os resultados dos (Quadros 16 e 17

e Figura 4) indicam que o pH ótimo se encontrava dentro do intervalo de 3,3 - 4,2, com velocidades de reações inferiores para valores de pH mais altos. Uma comparação dêsses dados com os do Quadro 10, mostra que o pH ótimo para a descarboxilação do malato é mais baixo do que aquêle para o crescimento, e está mais próximo da reação da maioria dos mostos e vinhos.

Etanol. O efeito do etanol na velocidade da reação foi investigado pela adição de diferentes quantidades de álcool etílico absoluto à mistura reativa esterilizada. Não foi detectada nenhuma redução da velocidade de conversão devida ao álcool (Quadro 18). Desta forma, o etanol a 10% deu valores similares àqueles obtidos quando o álcool era omitido.

Pôde-se ver que descarboxilações mais rápidas ocorreram nas misturas contendo 6 e 8% de álcool. Não se sabe se êsses resultados eram devidos ao etanol, ou a alguma outra variável desconhecida. Novamente, êsses resultados mostram uma diferença marcante entre as respostas das células em multiplicação e em repouso, pois que o crescimento celular era inibido por etanol em quantidades tão poucas como 4% (Quadro 11).

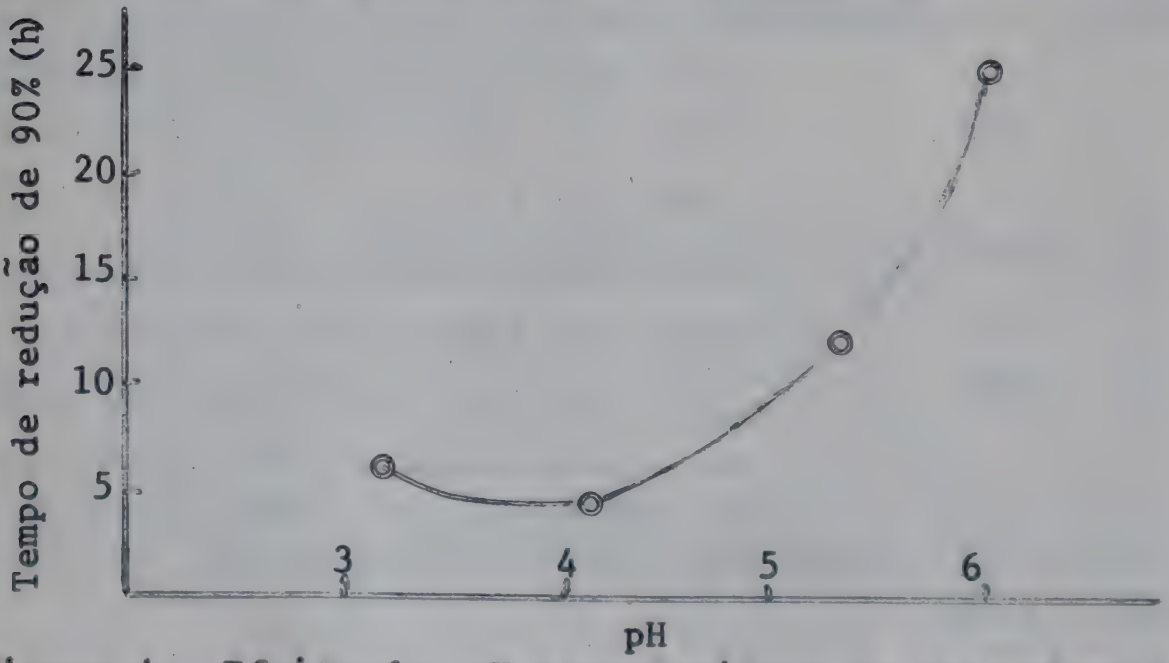


Figura 4. Efeito do pH na velocidade de descarboxilação do malato. Mistura reativa: ácido málico 2,5 g/ℓ; $MnCl_2$ 0,002M; Glicose 1g/ℓ células 2,4 x 10^{10}/ml.

Quadro 18. Efeito do etanol na velocidade de descarboxilação do malato.

Etanol (v/v)	Ácido málico (g/ℓ)				
Incubação(h)	0	2	4	6	20
0	2,22	0,48	0,04	0,0	0,0
2	2,22	0,56	0,11	0,03	0,03
4	1,92	0,53	0,14	0,0	0,0
6	2,05	0,27	0,04	0,10	0,0
8	2,12	0,08	0,05	0,05	0,0
10	2,04	0,39	0,10	0,0	0,0

Mistura reativa: ácido málico 2,5 g/ℓ; $MnCl_2$ 0,002M; solução tampão de fosfato 0,05M; pH 4,5; células 6 x 10^9/ml. Temperatura de incubação 37°C.

SO_2. O efeito do SO_2 na decomposição do ácido málico foi estudado adicionando-se uma solução de bissulfito à mistura reativa esterilizada, para dar os valores totais de SO_2 variando de 0 a 100 p.p.m.. Neste estudo foi usado um tampão de ftalato-NaOH para impedir as variações de pH. Os resultados mostraram que dentro da faixa de 0 a 100 p.p.m de SO_2, a velocidade do malato não era afetada. Por outro lado, o crescimento de ML-34 foi marcadamente inibido por 20 p.p.m.e completamente bloqueado por níveis de 50 p.p.m. e acima (Quadro 12).

Quadro 19. Efeito do SO_2 na velocidade de descarboxilação do malato.

SO_2 p.p.m.	Ácido málico (g/ℓ)				
Incubação (h)	0	0,5	1,0	5,0	20
0	4,37	4,05	3,32	1,96	0,26
20	3,97	3,40	3,63	1,40	0,13
50	4,18	4,19	3,56	1,48	0,13
70	4,48	4,18	3,49	1,29	0,10
100	4,56	3,87	3,64	1,43	0,10

Mistura reativa: ácido málico 5 g/ℓ; $MnCl_2$ 0,002 M; células 2,2 x 10^9/ml. Temperatura de incubação = 37°C; Solução tampão ftalato-NaOH = pH 4,5.

Temperatura. Desde que a temperatura ótima para a decomposiçao enzímica do malato também pode ser diferente daquela para o crescimento, foi igualmente investigado o efeito da temperatura, incubando-se a mistura reativa em banhos-maria com temperatura variando entre 16 a 37°C. Para assegurar-se de que a temperatura desejada era alcançada imediatamente, os tubos de suspensão celular e solução de ácido málico foram equilibrados separadamente no banho, antes de serem misturados. A Figura 5 mostra que a descarboxilação mais rápida ocorreu a 37°C, temperatura mais elevada do que a ótima para o crescimento (Quadro 14).

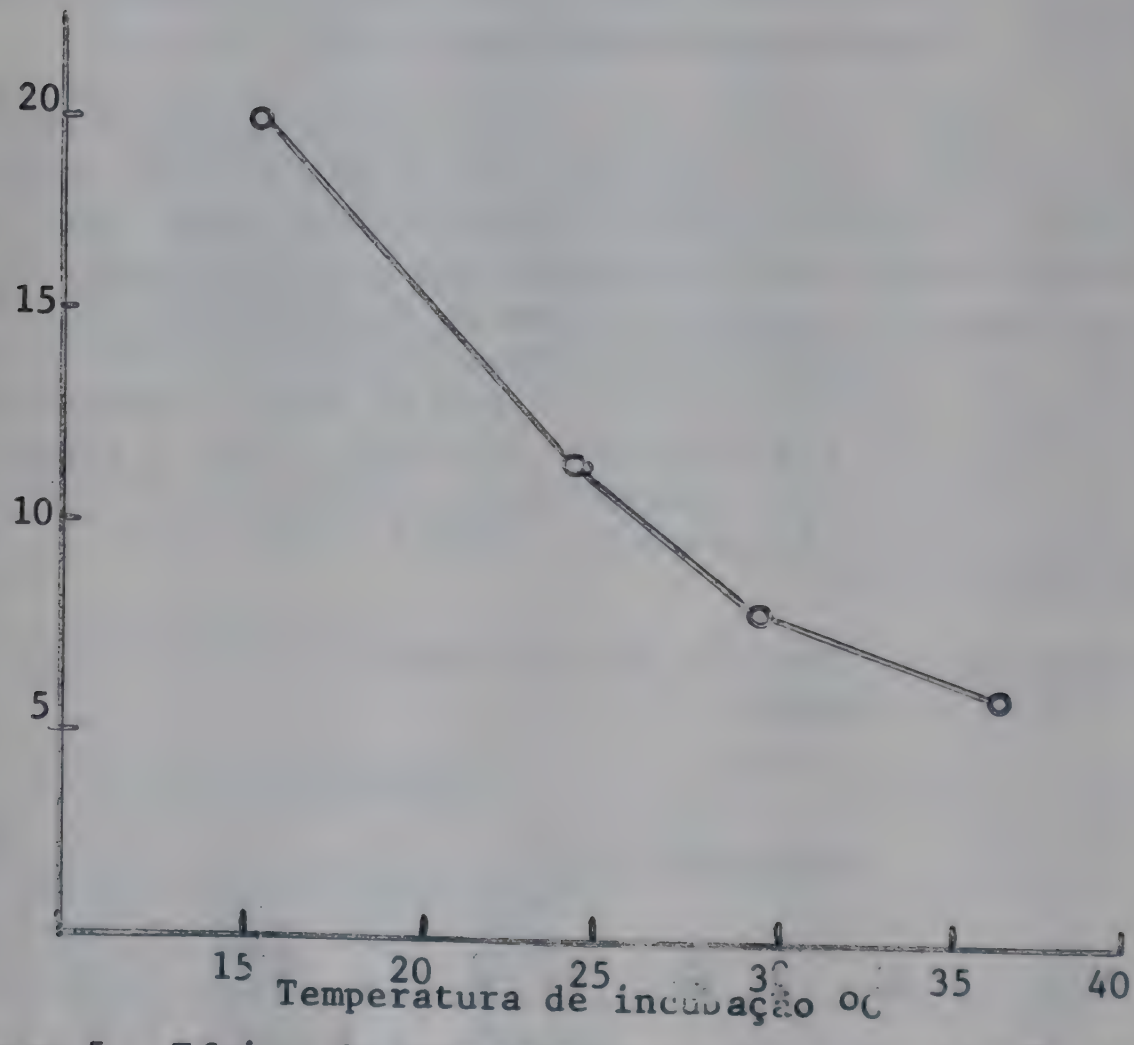


Figura 5. Efeito da temperatura na descarboxilação do malato.

Mistura reativa: ácido málico 5 g/ℓ; $MnCl_2$ 0,002M; pH 4,4 células: 5 x 10^9/ml.

Indução do ênzimo málico. A capacidade da linhagem para formar um ênzimo málico induzível foi examinada comparando-se a velocidade de descarboxilação por células em repouso, que foram cultivadas na presença e na ausência de ácido málico. A fonte de ácido málico no meio de crescimento era de suco de uva presente a uma concentração de 20% (v/v). A fim de produzir uma cultura celular não exposta ao ácido málico, as culturas de caldo TGYE foram incubadas sob atmosfera de CO_2. Para evitar algum ácido málico residual introduzido com o inóculo inicial cultivado no meio Rogosa, foram feitas três transferências em série nos tubos com o caldo TGYE, antes da inoculação dos frascos Erlenmeyer, nos quais as culturas de células foram propagadas. Utilizou-se uma alça de platina para as transferências das culturas, de modo que o transporte de ácido málico foi minimizado. As culturas no caldo TGYE foram incubadas durante 4 dias sob uma atmosfera de CO_2. A cultura de células induzidas de ácido málico, foi preparada inoculando-se 1 ml de uma cultura de caldo Rogosa em 1 litro de caldo TGJ-20, que também foi incubado por 4 dias. Após lavagem, o número de células viáveis dos dois meios foi determinado por contagem em placas. A velocidade de decomposição do ácido málico foi, então, determinada por procedimento padrão.

O resultado (Quadro 20) sugere que o sistema de ênzimo málico na linhagem ML-34 é do tipo induzível. Assim, quando a velocidade de diminuição do malato era expressa na base de g/células viáveis, a atividade das células cultivadas no malato era cêrca de dez vêzes maior do que a das células não expostas prèviamente ao ácido. A diferença na velocidade era suficientemente grande, uma vez que as células cultivadas em presença de malato apresentaram um menor tempo de redução de 90%, muito embora um número consideràvelmente menor dessas células estivesse presente.

As verificações de que o SO_2 e etanol não mostraram efeito na velocidade de descarboxilação do ácido málico, levou-nos a investigar a atividade do ên-

zimo málico das células em repouso incubadas em amostras de vinhos. Os vinhos eram tipos experimentais produzidos no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em Geneva, New York. Sua composição pode ser vista no Quadro 21. Neste estudo, 10 ml de células lavadas e suspensas em água, foram adicionadas a um volume igual de vinho. Isto resultou numa diluição do vinho original de 1:2. Os resultados (Quadro 22) não mostraram diferença significativa na velocidade de decomposição do malato nos diferentes vinhos diluídos. Os tempos de redução de 90% eram comparáveis àqueles obtidos nos diferentes ensaios, em que foi usada a mistura reativa padrão (Quadro 15). Assim, não foram detectados efeitos estimuladores ou inibidores devidos aos vinhos.

Quadro 20. Efeito da presença do ácido málico no meio de crescimento na velocidade de descarboxilação das células em repouso.

Meio de crescimento [a]	Concentração das células em repouso/ml	µg de malato [b] consumido por células/h x 10^3	Redução de 90% (h)
Malato livre	$1,3 \times 10^9$	0,48	8,3
Malato presente	$1,5 \times 10^8$	4,20	5,0

a = TGYE básico. b = Mistura reativa; ácido málico 5 g/litro; $MnCl_2$; 0,002M; pH 4,5; Incubado a 37°C.

Quadro 21. Composição química das amostras de vinho de New York.

Vinho [a]	Ácido L-málico g/ℓ	SO_2 livre p.p.m.	Álcool	pH
66 - 1	2,59	17	12,2	3,50
66 - 16	2,45	14	11,6	3,30
66 - 86	1,68	< 10	12,7	3,30
66 - 125	2,48	< 10	12,6	3,30
66 - 195	2,22	< 10	14,4	3,30
S - 1086	4,07	< 10	12,1	3,15
68 - 58	2,70	25	12,1	3,15

a = Refere-se ao ano e número da adega, com exceção de S-1086, que é uma variedade de uva usada para a fabricação dêste vinho.

Quadro 22. Tempo de descarboxilação do malato em amostras de vinho diluído.

Amostras	Redução de 90% (horas)
66- 1	4,2
66- 16	4,3
66- 86	3,4
66-175	7,2
66-195	6,2

Células" 1,5 x 10^9/ml; temperatura de incubação 37°C.

O experimento foi repetido, usando-se dois vinhos não diluídos: Seibel branco (S-1086) e Concord tinto (6858) (Quadro 21). Para contrôle, algumas células foram incubadas na mistura reativa padrão. Os resultados (Quadro 23) mostraram que a fermentação malo-láctica nos vinhos se processou a uma velocidade mais lenta do que na mistura reativa padrão. O tempo de redução de 90% foi aproximadamente de 9 horas na mistura reativa padrão, 56 horas no vinho Seibel, e 21 horas no vinho Concord. Não é compreendida a razão dessas velocidades baixas nos vinhos Seibel e Concord. A amostra-contrôle deu uma velocidade de desdobramento semelhante àquela obtida em outros ensaios, e assim, as células pareceram ser normais. A ligeira diferença no número de células nas diferentes suspensões não seriam responsáveis pelas marcantes diferenças nas velocidades de desdobramento. O pH 3,15 dos vinhos era mais baixo do que aquêle verificado nos estudos das células em repouso (Figura 4). Entretanto, êsses resultados indicaram que um pH inferior a 3,5 proporcionava velocidades de descarboxilação relativamente rápidas. Embora o conteúdo de álcool de 12,1 fôsse cêrca de 2% maior do que o usado nos primeiros estudos da velocidade de reação (Quadro 19), deve-se assinalar que uma concentração de 10% de etanol não causava inibição na descarboxilação por células em repouso. Assim, enquanto que uma alta concentração de etanol ou um pH adverso não pode ser completamente ex-

cluído como causa da lenta fermentação malo-láctica nas duas amostras de vinho, nossa experiência com células em repouso de ML-34 sugere que os vinhos continham outra substância ou substâncias que inibiram a reação.

Inoculação dos vinhos. Seguindo-se aos estudos de crescimento e células em repouso, foram realizadas experiências para determinar se a fermentação malo-láctica poderia ser induzida em vários mostos (qualquer suco fermentescível) e vinhos. O objetivo foi estudar o efeito do pH e da concentração de etanol, quando o ML-34 era propagado no ambiente natural do vinho. Também foi investigada a possibilidade do ML-34 crescer em mosto juntamente com a levedura como inóculo. Lotes de um galão de três sucos brancos e dois tintos, foram inoculados com ML-34 a 1% por volume. Os três sucos brancos foram prèviamente inoculados com a linhagem de levedura Montrachet, e a fermentação alcoólica prosseguia normalmente quando o ML-34 foi introduzido (Quadro 24). Os mostos tintos não foram inoculados com leveduras e, desta forma, sofreram uma fermentação natural; pequena quantidade de etanol havia sido formada no momento em que o ML-34 foi adicionado.

Quadro 23. Tempo de descarboxilação do malato em mistura reativa e amostras de vinho

Amostras	Células em repouso por ml	Ácido L-málico g/litro					
		Incubação (h)					
		0	0,5	1,0	2,0	3,0	20
Mistura reativa padrão	$8,5 \times 10^8$	4,87	4,29	3,66	2,57	2,10	1,10
Seibel S - 1086	$4,1 \times 10^8$	4,07	3,79	3,91	3,82	3,68	3,79
Concord 68 - 68	$8,2 \times 10^8$	2,70	2,57	2,92	2,18	2,15	2,17

Mistura reativa: ácido málico, $NMnCL_2$ 0,002M, pH 4,5. Incubação - temperatura 37°C.

Em seguida à inoculação com ML-34, foram feitas determinações periódicas do ácido málico. Os resultados (Quadro 25) mostraram que durante um período de incubação de 48 dias, sòmente uma das amostras sofreu fermentação malo-láctica. Êste mosto tinto tinha

um pH inicial mais elevado, o que, provàvelmente, explica porque apenas êle permitiu o crescimento do ML-34. Pode-se ver que o outro suco tinto, que também continha pouco de etanol no momento da inoculação, tinha um pH de 3,2 e não sofreu a fermentação malo-láctica.

Quadro 24. Composição química das amostras de vinho de New York, no momento da inoculação com ML-34.

Variedade de uva	pH	Acidez total	% etanol (v/v)	Levedura inoculada
Seibel branco	3,10	1,7	9,6	Montrachet
Seibel branco	3,32	0,5	9,0	Montrachet
Seibel branco	3,10	1,0	9,4	Montrachet
Concord tinto	4,10	0,7	0,0	Nenhuma
Concord tinto	3,20	1,2	0,0	Nenhuma

Quadro 25. Desaparecimento do ácido málico nas amostras de vinho de New York.

Variedade de uva	Ácido L-málico g/l Tempo em dias							
	0	4	14	17	21	28	34	48
Seibel branco	1,76	1,58	1,85	1,65	1,65	1,58	1,47	1,79
Seibel branco	1,81	1,57	1,76	1,76	1,66	1,62	1,43	1,94
Seibel branco	1,85	1,65	1,75	1,75	1,62	1,67	1,52	2,03
Concord tinto	1,72	1,09	0,71	0,49	0,17	-	-	-
Concord tinto	2,76	1,92	1,97	1,97	1,94	1,85	1,77	2,48

Incubação : Temperatura ambiente.

O experimento acima indicou que o pH tinha um efeito crítico na fermentação malo-láctica e mostrou a necessidade de se obter dados adicionais, em relação aos efeitos combinados de pH e etanol. Para esse subseqüente estudo, foi inoculado o ML-34 em vinho sêco, no qual foram ajustados os níveis de pH e de etanol. Procedeu-se à destilação a vácuo a 43°C para reduzir a concentração de etanol de 13,4% para 3,5%. Diferentes quantidades de álcool e água destilada foram depois readicionadas ao concentrado de vinho, para fornecerem concentrações de álcool variando de 2,4 a 10% (v/v) e para resta-

belecer a concentração dos outros componentes àquela do vinho original. Cada amostra representando uma dada concentração alcoólica foi separada em subamostras para ajustamento do pH entre 3,0 a 4,0. As amostras (88 ml em recipientes padrões para diluição do leite) foram, então, inoculadas com ML-34 a um nível de 1% (v/v). Após inoculação foram incubadas a 30°C e periòdicamente, foram retiradas amostras para determinações do ácido málico. Os resultados (Quadro 26) mostraram que dentro de 40 dias em concentrações de etanol acima de 6%, não houve decréscimo na quantidade de ácido málico em qualquer pH. As amostras de tôdas as concentrações de etanol, com pH inferior a 4,0, também não sofreram a fermentação malo-láctica. Embora os resultados pareçam ser desencorajadores, cogitou-se de saber se a fermentação malo-láctica poderia ocorrer em outras amostras se fôssem incubadas por um período mais longo do que 40 dias. Período mais longo de incubação poderia permitir a adaptação de algumas células e o crescimento subseqüente poderia levar a efeito a transformação malo-láctica.

Quadro 26. Efeitos do pH e do etanol do vinho, na velocidade da fermentação malo-láctica.

Etanol			Ácido L-málico g/l			
Inicial	Final	pH	Dias 0	15	18	40
2,4	2,1	3,0	1,24	1,61	1,79	1,74
2,4	2,1	4,0	1,23	0,15	0,13	0,07
6,0	4,5	3,0	1,10	1,47	1,72	1,52
6,0	4,5	3,5	1,16	1,45	1,64	1,68
6,0	4,6	4,0	1,16	1,41	1,60	0,15
8,7	7,8	3,0	1,18	1,54	1,89	1,83
8,7	7,7	3,5	1,24	1,69	1,75	1,78
8,7	8,3	4,0	1,29	1,71	1,75	1,86
10,0	8,3	3,0	1,23	1,59	1,74	1,66
10,0	8,8	3,5	1,16	1,57	1,69	1,68
10,0	9,1	4,0	1,26	1,50	1,55	1,58

Temperatura de incubação 30°C.

O fato de que vinhos inoculados freqüentemente fracassaram em permitir a fermentação malo-láctica, levantou a questão quanto às modificações na contagem das células viáveis de ML-34 após a inoculação. Vinhos Concord tinto e Seibel branco, foram inoculados e plaqueados imediatamente. Os resultados (Quadro 28) de um plaqueamento subseqüente após dois dias, mostraram que poucas células haviam sobrevivido. Os plaqueamentos posteriores de vinho não diluído durante uma incubação de 50 dias, falharam em produzir colônias visíveis. As determinações de ácido málico feitas durante êsse período, também não mostraram modificações na concentração dêste ácido.

Quadro 27. Composição química das amostras de vinho de New York.

Variedade	pH	SO_2 livre	% etanol	Ácido málico
		p.p.m.	(v/v)	(g/ℓ)
Seibel branco S-10868	3,15	< 10	10	3,15
Concord tinto 68-58	3,15	25	10	2,54
Riesling branco	3,15	< 10	10	2,04

Quadro 28. Números viáveis de células de ML-34, em vinhos inoculados.

Vinho	Período de incubação	Contagem das células viáveis	% de sobrevivência
Seibel S-10868	0 h	$1,5 \times 10^7$	$<0,006$
	2 dias	$< 1 \times 10^3$	
Concord 68-58	0 h	5×10	$<0,02$
	2 dias	$< 1 \times 10^3$	
Riesling	0 h	$2,1 \times 10^7$	$<0,004$
	7 h	$< 1 \times 10^3$	

Temperatura de incubação : 30°C.

O efeito tóxico dos vinhos também foi observado pela inoculação do vinho Riesling (Quadro 27). Após 7 horas, menos de 0,004% das células permaneceram viáveis (Quadro 28). Êsses resultados levaram-nos a concluir que é muito difícil induzir uma fermentação malo-láctica em vinhos acabados.

Na Estação Experimental de New York, a fermentação malo-láctica foi induzida com êxito em vinhos tintos, quando cêrca de 3,0% (v/v) de ML-34 eram introduzidos nessas amostras, ao mesmo tempo que eram inoculadas com levedura. A fermentação malo-láctica foi acompanhada qualitativamente por cromatografia de papel, antes e depois do término da fermentação alcoólica. O final foi caracterizado pela ausência de manchas de ácido málico no papel. As mudanças no pH e na acidez total podem ser vistas no Quadro 29. A determinação quantitativa do ácido málico realizada na amostra S-9549, mostrou que êste ácido decresceu de 2,11 para 0,13 g/ℓ, ao final da fermentação, sendo que esta diminuição seria responsável pela perda da acidez total nessa amostra. Acredita-se que a transformação malo-láctica tenha sido o resultado de crescimento em lugar de um efeito das células em repouso. Assumindo que as culturas líquidas usadas como inóculo continham o número usual de cêrca de 10^9 células/ml, os vinhos com 3% dêste inóculo conteriam um número de células cêrca de 3×10^7 células/ml, que é demasiado baixo para a degradação malo-láctica se processar como um efeito de células em repouso (Figura 3).

A fermentação malo-láctica falhou em desenvolver, quando 3% do ML-34 foram inoculados em variedades brancas (Quadro 29). Desde que o pH e a acidez de ambos os tipos de vinhos eram semelhantes, é possível que a fermentação malo-láctica falhasse em se desenvolver nos vinhos brancos, devido à ausência de cascas durante a fermentação dêsses vinhos (24, 25).

Quadro 29. Modificações químicas em vinhos de fermentação malo-láctica.

Variedades	pH		Ácido málico	Acidez total[c]	
	Inicial[b]	Final		Inicial	Final
Vinhos tintos					
L-Millot	3,73	3,83	-	0,50	0,42
Foch	3,55	3,85	-	0,74	0,67
S-8357[a]	2,98	3,15	-	1,43	1,13
J-59-149	3,43	3,85	-	0,88	0,71
NY-34791	4,13	4,33	-	0,62	0,48
S-9549[a]	-	-	-	0,69	0,45
S-9549[a]	3,16	3,39	-	0,82	0,65
Vinhos brancos					
Delaware[a]	3,14	3,14	+	0,99	1,00
Ravat	3,50	3,50	+	0,95	0,95
Gw-3	3,02	3,02	+	0,71	0,72
Dutchess	3,63	3,63	+	0,43	0,43
Seibel 10868[a]	3,50	3,50	+	0,63	0,60
Gw-3	3,40	3,40	+	0,70	0,69
Naples	3,15	3,15	+	0,80	0,81
Gw-4	3,45	3,45	+	0,83	0,83

a - 0,2% de $CaCO_3$ adicionado ao suco antes da fermentação. b - Leitura do pH inicial depois da adição do $CaCO_3$. c - Acidez total expressa em % de ácido tartárico. (-) Ácido málico ausente. (+) ácido málico presente.

DISCUSSÃO

O fraco crescimento de ML-34 em meio comum de laboratório, ilustra a fastiosidade dos organismos malo-lácticos, o que está em acôrdo com os resultados de outros pesquisadores (16, 24, 49). Poderia parecer, entretanto, que as exigências específicas de crescimento variam com a linhagem. Assim, a verificação neste estudo, de que o crescimento era estimulado por sucos de tomate ou uva, concorda com os resultados de YOSHIZUME e AMACHI (46). Ao contrário, GARVIE e MABBITT (16) não encontraram melhoria no crescimento de *Leuconostoc oenos* pela adição de suco de uva a um caldo com ácidos cítrico e málico. É possível, também, que diferenças no meio básico, do que entre as linhagens de bactérias, seriam causas para a falta de concordância nos resultados. Nossos estudos sugerem que o estímulo do crescimento pelo suco de tomate ou de uva não era devido aos carboidratos comuns ou ácidos orgânicos presentes nesses sucos. Assim, a adição dêsses componentes ao meio básico não produziu aumento no crescimento do ML-34 (Quadro 9).

O crescimento de ML-34 também foi favorecido pela incubação do TGYE sob uma atmosfera de CO_2. GARVIE (14) verificou que o crescimento de certas linhagens de *Leuconostoc oenos* era estimulado tanto pela cisteína como pela incubação numa atmosfera de H_2 e CO_2. Cocluiu que condições anaeróbias eram requeridas para crescimento. Nossas verificações, de que o suco de tomate ou de uva permitiram um bom crescimento quando o ML-34 era cultivado aeròbiamente, sugerem que o CO_2 exercia um outro papel além daquele de proporcionar ambiente anaeróbio. Também os resultados de outro experimento e o trabalho de STAMER (comunicação pessoal), mostraram que o crescimento do ML-34 não era estimulado quando o CO_2 era substituído por H_2. Nenhum relato foi encontrado na literatura, indicando que o CO_2, suco de tomate ou de uva, possam substituir um ao outro como estimulantes de crescimento para outras espécies malo-lácticas. Não se sabe, portanto, se êste fenômeno é específico para o ML-34.

Verificou-se que o ácido málico, nos níveis comumente presentes no suco de uva, inibia o crescimento de ML-34. Os dados sugerem que a forma L era o isômero inibidor, visto que uma quantidade, tanto quanto duas vêzes maior da mistura racêmica, era necessária para produzir um determinado nível de inibição (Quadro 13). Deve-se notar que não era observada inibição no ensaio em que foi adicionada uma mistura de ácidos orgânicos, incluindo o ácido málico (Quadro 9). É importante assinalar, contudo, que no último experimento, o crescimento foi apenas medido após 6 dias e, portanto, é provável que alguma inibição inicial no crescimento pelo malato fôsse perdida. Assim, é possível que a supressão do crescimento pudesse ter sido observada nesse experimento, se tivéssemos seguido o crescimento medindo a densidade óptica a intervalos de tempo mais curtos.

É aparente que as linhagens individuais de *Leuconostoc* de vinhos respondem diferentemente à presença de ácidos orgânicos no meio de cultura. BIDAM (4) encontrou a utilização do ácido málico pelo *Leuconostoc* do vinho, enquanto KUNKEE (24) não verificou aumento no crescimento quando foram adicionados os ácidos L-málico, cítrico ou acético para enriquecer o meio DIFCO C.F. MEIRATH e LUTHI (29) observaram que o ácido cítrico estimulava o crescimento de tôdas as linhagens e era essencial para algumas. GARVIE e MABBITT (16) detectaram a inibição do *L. oenos* pelo ácido málico, e que esta inibição era superada pela adição de suco de tomate.

Diferenças consideráveis foram encontradas entre as condições melhores para crescimento "versus" aquelas favorecendo a atividade do ênzimo malo-láctico. O pH ótimo para crescimento do ML-34 estava no intervalo de 4,5 a 5,4 o que geralmente concorda com os dados de outros pesquisadores (18, 45). Um valor algo mais baixo de pH no intervalo de 3,3 a 4,2, foi encontrado como ótimo para a velocidade de descarboxilação do malato pelas células em repouso, o que também está de acôrdo com outros estudos (9, 49).

Encontramos que alguns vinhos podem inibir fortemente o crescimento do ML-34. Utilizando um meio de laboratório, o crescimento foi retardado por 4% de etanol e completamente suprimido por concentrações de álcool superiores a 10%. Os dados concordam com aquêles de GARVIE (14), que verificou ser o *L. oenos* a única espécie de *Leuconostoc* capaz de crescer na presença de 10% de etanol. Diferentemente do crescimento, a degradação do malato não era afetada por etanol a 10%. Êsses resultados diferem daqueles de RADLER (35), que relatou forte inibição de descarboxilação pelas células em repouso de *Lactobacillus plantarum* por 10% de etanol em pH 4,0, enquanto que pouca inibição foi encontrada em pH 5,6, mesmo em concentrações de etanol superiores a 20%.

Inibição no crescimento do ML-34 foi detectada a uma concentração de 20 p.p.m. de SO_2 total, enquanto que em níveis mais elevados houve completa supressão do crescimento. A atividade do ênzimo málico não foi afetada pela concentração de 100 p.p.m. de SO_2 total. RADLER (38) por sua vez, obteve resultados diferentes quando verificou que 82% da atividade do ênzimo málico eram inibidas por 8 p.p.m. de SO_2. É possível que os ênzimos málicos de *L. plantarum* e ML-34 diferiram quanto à sua sensibilidade ao SO_2. Uma outra explicação é que as nossas condições experimentais eram diferentes. RADLER mediu a velocidade de descarboxilação por períodos de minutos, enquanto em nosso trabalho a atividade enzímica foi seguida durante 20 horas, sendo de 30 minutos o intervalo de tempo mais curto entre as amostragens. Se a inibição apenas ocorria no início da reação, o manômetro o teria detectado, enquanto que seria perdida em nosso esquema de amostragem.

Alguns investigadores relataram que certas bactérias lácticas formam um ênzimo málico induzível (5, 10, 49), enquanto que desidrogênase láctica, que faz parte do sistema de ênzimo málico, é um ênzimo constitutivo (5). Verificamos, assim, como outros pesquisadores (5), que o desdobramento do ácido málico pelas células em repouso era cêrca de 10 vêzes mais

rápido quando as células eram cultivadas na presença de malato. Nossos resultados conclusivamente, não provaram, no entanto, que o ênzimo málico do ML-34 é induzível, visto que o meio usado para a produção das células "induzidas" e "não induzidas" diferia não apenas pela presença ou ausência de ácido málico, mas também pela presença de outros compomentes de suco de uva no meio TGJ-20. Ademais, não se sabe se a atividade do ênzimo málico era afetada pela atmosfera saturada de CO_2 que foi usada para a produção de células "não induzidas". FLESH (10) apontou que os cocos heterofermentativos podem possuir ou ênzimo induzível ou constitutivo, dependendo das condições de crescimento.

Os resultados dos estudos de crescimento e de células em repouso demonstraram que uma determinada população celular era requerida para desencadear a conversão malo-láctica. Foi detectado um decréscimo na concentração de malato quando eram presentes cêrca de 10^8 células/ml, seja resultante de crescimento celular, seja pela introdução de uma suspensão concentrada de células, enquanto que pequena quantidade de ácido málico era convertida em concentrações celulares abaixo dêsse valor. É de interêsse que uma concentração de 1 a 4 x 10^9 células não reprodutoras/ml de uma bactéria malo-láctica tenha sido usada para decompor o ácido málico de vinhos (10).

O estudo das células em repouso em vinhos indicou que, pelo menos em alguns vinhos, havia um inibidor da transformação malo-láctica. Assim, os vinhos Seibel e Concord tiveram velocidades de crescimento mais lentas do que a mistura reativa padrão (Quadro 23). A causa dessa inibição não é compreendida, visto que outros estudos sugeriram que o nível de SO_2 ou o pH não seriam os fatôres responsáveis. A concentração de 12% de etanol poderia ter sido inibidora, embora se deva apontar que 10% de etanol não reduzia a velocidade. Outros estudos sôbre velocidade de reação mostraram não haver inibição quando eram adicionadas células em repouso aos vinhos diluídos com água na proporção de 1:2. Êsses vinhos eram diferentes, de modo que não

se sabe se foi a diluição ou alguns outros fatôres, os responsáveis para essa diferença nos resultados.

Em um número limitado de ensaios, foram feitas algumas tentativas para induzir a fermentação malo-láctica em vinhos acabados pela adição de grandes quantidades do inóculo ML-34. Nenhuma foi bem sucedida. A contagem de microrganismos viáveis após a inoculação, explica os resultados negativos. Assim, menos de 0,004% de células ML-34 sobreviveram depois de 7 horas de inoculação em um vinho tinto (Quadro 28). Isso explicaria o porquê da dificuldade de se conseguir a conversão malo-láctica depois do término da fermentação alcoólica, pois que o crescimento seria necessário para alcançar a concentração celular desejada. Estudos sôbre os efeitos do pH e etanol, mostraram que uma interação entre os dois pode ser responsável, pois que uma combinação de apenas 6% de etanol aliada a um pH de 3,5 impedia a fermentação. É possível que outros constituintes desconhecidos do vinho, também sejam inibidores ao crescimento do ML-34.

Não obstante, fomos capazes de induzir a fermentação malo-láctica, quando ML-34 era inoculado juntamente com levedura.

A fermentação malo-láctica foi induzida com êxito em vinhos tintos, mas não em brancos, adicionando-se ML-34 ao mesmo tempo que a levedura. Usando-se 1-3% de inóculo ML-34, a fermentação ocorria em mostos com pH abaixo de 3,0. O baixo conteúdo de etanol e o fato de que os nutrientes não haviam sido totalmente consumidos pela levedura, podem ser a razão para êsse êxito (48). Além do mais, as incubações por mais tempo podem ter permitido a seleção de linhagem "tolerantes ao vinho", que fôssem capazes de crescer e levar a efeito a fermentação. O nosso fracasso em induzir a fermentação em mostos de vinhos brancos, concorda com os resultados de KUNKEE (25), que o atribuiu à ausência de casca de uva na fermentação de vinhos brancos. Um levantamento sôbre incidência da fermentação malo-láctica nos vinhos de New York, também indicou que a fer-

mentação expontânea era mais provável ocorrer em vinhos tintos (40).

Nossos estudos demonstraram que os mostos e vinhos da região leste dos E.U.A., não são meios muito favoráveis para o ML-34. Os dados sugeriram, entretanto, que algum êxito pode ser alcançado quando o ML-34 é inoculado conjuntamente com a levedura. Também poderia ser conseguido, introduzindo-se uma suspensão concentrada de células não reprodutoras. As desvantagens em se trabalhar com tais quantidades de células, pode ser fàcilmente visualizadas nas grandes vinhaterias.

É provável que o isolamento e seleção de uma linhagem local adequada, dos vinhos e mostos do leste, fôssem de maior interêsse e, possìvelmente, de maior êxito na indução da fermentação malo-láctica nesses vinhos.

LITERATURA

1. AMERINE, M. A. Laboratory procedures for enologists. Associated Students Stores, University of California, Davis, California, 1965.

2. BALARD, A. J. Sur une alteration spontanee de certains vins. Compt. Rend. 53: 1226-1230, 1961.

3. BARKER, S.B. & W. H. SUMMERSON. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. J. Biol. Chem. 138: 535-554, 1941.

4. BIDAN, P. Sur quelques bacteries isolees des vins en fermentation malolactique. Ann. Technol. Agr. 5: 597-617. 1956.

5. BLANCHARD, M.L., KORKES, S., DEL CAMPILLO & OCHEA, S. Function of biotin in the metabolism of *Lactobacillus arabinosus*. J. Biol. Chem. 187: 875-890, 1950.

6. BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. & SMITH, N.R. Bergey's manual of determinative bacteriology. 7th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1957.

7. DEAL, S.J. & LICHSTEIN, H.C. Malic enzyme induction by lactic acid bacteria. I-A method for the study of nutritional interactions. Can. J. Microbiol. 7: 153-161, 1961.

8. du PLESSIS, L. de W. The microbiology of South African winemaking. Part II. Degradation of citric acid and L-malic acid by lactic acid bacteria from dry wines. S. African J. Agr. Sci. 7: 31-42, 1964.

9. FLESH, P. Morphologie,stoffwechselphysiologie und charakterisierung der malicenzym-akctivitat L-apfelsaure-abbauender bakterien. Arch. Mikrobiol. 60: 285-302, 1968.

10. _____. Malic-enzym-synthese und pH-adaptation bei L-apfelsaure abbauenden bakterien. Arch. Mikrobiol. 64: 9-22, 1968.

11. FORNACHON, J. C. M. The occurrence of malo-lactic fermentation in Australian wines. Australian J. Appl. Sci. 8: 120-129, 1957.

12. _____. Inhibition of certain lactic acid bacteria by free and bound sulphur dioxide. J.Sci. Fd. Agric. 14: 857-862, 1963.

13. GARINO-CANINA, E. La fermentation de l'acide malique dans la technique oenologique. Bull. Offic. Intern. Vin. 16: 63-76, 1943.

14. GARVIE, E.I. *Leuconostoc oenos* sp. nov. J. gen. Microbiol. 48: 431-438, 1967.

15. _____. The growth factor and amino acid requirements of the genus *Leuconostoc*, including

Leuconostoc paramesenteroides (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. J. gen. Microbiol.48: 439-447, 1967.

6. GARVIE, E.I. & MABBITT, L.A. Stimulation of the growth of *Leuconostoc oenos* by tomato juice. Arch. Mikrobiol. 55: 398-407, 1967.

7. HOLMES, B., SANDINE, W.E. & ELLIKER, P.R. Some factors influencing carbon dioxide production by *Leuconostoc citrovorum*. Appl. Microbiol. 16: 56-61, 1968.

8. INGRAHAM, J. L., VAUGHN, R. H. & COOKE, G. M. Studies on the malo-lactic organisms isolate from California wines. Am. J. Enol.Viticult. 11:1-4, 1960.

9. JERCHEL, D., FLESH, P. & BAUER, E. Untersuchungen zum abbau der L-apfelsaure durch *Bacterium gracile*. Annalen 601: 40-60, 1956.

10. KOCH, A. Ueber die ursachen des verschwindens der saure bei gahrung und lagerung des weines. Wenbau u. Weinhandel 18: 395-419, 1900.

11. KORKES, S., Del CAMPILLO, A. & OCHOA, S. Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. J. Biol. Chem. 187: 891-905, 1950.

12. _____ & OCHOA, S. Adaptive conversion of malate to lactate and carbon dioxide by *Lactobacillus arabinosus*. J. Biol. Chem. 176:463 - 464, 1948.

13. KULISH, P. Ueber die abnahme der saure in obst- und trauben weinen wahrend der gahrung und lagerung. Weinbau u. Weinhandel 7: 459-460. 1889.

14. KUNKEE, R. E. Malo-lactic fermentation. Advan. Appl. Microbiol. 9: 235-279, 1967.

25. KUNKEE, R.E. Control of malo-lactic fermentation induced by *Leuconostoc citrovorum*. Am. J. Enol. Viticult. 18: 71-77, 1967.

26. _____, OUGH, C. S. & AMERINE, M.A. Induction of malo-lactic fermentation by inoculation of must and wine with bacteria. Am. J. Enol. Viticult. 15: 178-183, 1964.

27. LUGG, J. W. N. & OVERELL, B.T. "One" and"two-dimensional" partition chromatographic separation of organic acids on an inert sheet support. Australian J. Sci. Res. Ser. A1: 98-111, 1959.

28. MAYER, K. & BUSCH, I. Uber une enzymatische apfelsaurebestimmung in wein und traubensalft. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 54: 60-65, 1963.

29. MÁYRATH, J. & LUTHI, H. R. On the metabolism of hexoses and pentoses by *Leuconostoc* isolated from wines and fruit juices. Lebensm -Viss. u. Technol. 2 (nº 1): 22-27, 1969.

30. MOSLINGER. Uber die sauren des weines und den sauerungsgang. Z. Untersuch. Nahr. Genussm. 4: 1120-1130, 1901.

31. MULLER-THURGAU, H. Uber die ergebnisse neuer untersuchungen auf dem gebiete der weibereitung. Ber. XII Deut. Weinbaukongr., Worms pp. 3-27. 1891.

32. _____. Bakterienblasen (Backeriosysten).Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II 20: 353-400,449-468, 1908.

33. PEYNAUD, E. & DOMERCQ, S. Possibilite de provo - quer la fermentation malolactique a l'aide de bacteries cultivees. Compt. Rend.Acad. Agr. 45: 355-358, 1958.

34. _____,_____. Etudes sur les bacteries lactiques des vins. Ann. Technol. Agr.10:43-60, 1961.

35. PILONE, G.J., KUNKEE, R.E. & WEBB, A.D. Chemical characterization of wines fermentated with variousmalo-lactic bacteria.Appl. Microbiol. 14: 608-615, 1966.

36. POITTEVIN, M.E. & CARRASCO, A. Estudio sobre la fermentation malalactica en vinos del Uruguay. Rev. Latinoam. Microbiol. Parasitol. 8: 33-37, 1966.

37. RADLER, F. Isolierung und charakterisierung von apfelsaure abauenden bakterien. Arhc. Mikrobiol. 30: 64-72, 1958.

38. _____. Die mikrobiologischen grundlagen des saureabbaues in wein. Zbl. Bakt. II Abt. 120: 238-287, 1966.

39. _____. Uber die milchaurebakterien des weines und den biologischen saureabbau. Vitis 3: 144-176, 1962.

40. RICE, A.C. The malo-lactic fermentation in New York State wines. Am. J. Enol. Viticult. 16: 62-68, 1965.

41. ROGOSA, M. & SHARPE, M.E. An approach to the classification of the lactobacilli. J. Appl. Bact. 22: 329-340, 1959.

42. _____, WISEMAN, R.F., MITCHEL, J.A., DISRAELY M.N. & BEAMAN, A.J. Species differentiation of oral lactobacilli from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius* nov. spec.and *Lactobacillus allobiosus* nov. sepc.

43. SEIFERT, W. Ueber die saureabnahme in wein und den dabei stattfindenden gahrungsprocess. Z. Landwirtsch. Versuchsw. Deut. -Oesterr. 4: 980-992, 1901.

44. VAUGHN, R.H. & TCHELISTCHEFF, A. Studies on the malic and fermentation of California table

wines. I. An Introduction to the problem. Am. J. Enol. 8: 74-79.

45. YOSHIZUME, H. Studies on the bacteria found during the process of wine making. II. Properties of malo-lactic fermentative bacteria. Agr. Biol. Chem. 27: 590-595, 1963.

46. _____ & AMACHI, T. Studies on the bacteria isolated from wine. IV. Distribution of the growth factor for a bacterium inducing malo-lactic fermentation. Agr. Biol. Chem. 33: 18 - 24, 1969.

47. WEBB, R.B. Laboratory studies of the malo-lactic fermentation. Am. J. Enol. Viticult. 13: 189-195, 1962.

48. _____ & INGRAHAM, J. L. Induced malo- lactic fermentation. Am. J. Enol. Viticult. 11: 59-63, 1960.

49. WHITING, G.C. & COGGINS, R. A. Metabolism of malate and citrate by lactic acid bacteria. Ann. Rept. Agr. Hort. Res. Sta., Long Ashon, Bristol, pp. 157-167, 1963.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/70

INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBOIDRATO SÔBRE A PRODUÇÃO DE ALFA-AMÍLASE FÚNGICA

Y. K. Park

RESUMO

É de suma importância, em fermentações enzímicas, o conhecimento da fonte de carboidrato a usar na composição do meio de cultura, que induza ao desenvolvimento de alta atividade enzímica.

Neste trabalho, foi estudada a produção do ênzimo alfa-amílase pelo microrganismo Aspergillus oryzae *38b, ATCC 11601, CTPTA 13, em meio de cultura cuja única variável era a fonte de carboidrato. Dos cinco diferentes carboidratos utilizados, a lactose foi o que apresentou melhor resultado, com o valor de 3.100 MWU de atividade enzímica em alfa-amílase, após 8 dias de incubação (192 horas), à temperatura ambiente, em um agitador rotativo de 100 r.p.m.*

SUMMARY

INFLUENCE OF CARBOYDRATE SOURCE ON THE PRODUCTION OF FUNGAL α-AMYLASE. *Production of α-amylase by submerged fermentation with* Aspergillus oryzae *386, ATCC 11601 was attempted by using culture media containing various carbohydrates, and found that culture media containing lactose was best media.*

INTRODUÇÃO

Em fermentações, especialmente naquelas destinadas à produção de ênzimos, as fontes de carboidratos são de grande importância. A finalidade dêste trabalho foi determinar, em meio de cultura básica, o carboidrato que propicia maior indução enzímica.

MATERIAL E MÉTODO

O microrganismo utilizado para estudo foi o *Aspergillus oryzae* 38b, ATCC 11601, CTPTA 13, empregando-se, como meio de cultura básica, o seguinte:

Caseína hidrolisada	0,50
Vinhaça sêca de destilaria de cereais	0,76
Levedura de cervejaria autolisada ...	0,40
Carboidrato	3,00
V_1Cl	0,05
$MgSO_4$ $7H_2O$	0,05
K_2HPO_4	0,10
$FeSO_4$	0,001

O pH foi ajustado para 5,5.

As variações estudadas na composição dos meios de cultura referem-se apenas às fontes de carboidrato, que foram as seguintes:

1. Amido
2. Amido hidrolisado
3. Lactose
4. Dextrose
5. Maltose

Foram usados frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo cada um 200 ml do meio de cultura apropriado, Uma vez adequadamente tamponados, foram esterilizados em autoclave à temperatura de 121°C durante 30 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, foi procedida a inoculação do microrganismo em referência, segundo técnica apropriada.

A incubação foi executada à temperatura ambiente, em um agitador rotativo a 100 r.p.m., durante 8 dias consecutivos (192 h).

Para avaliação da atividade enzímica, procedeu-se, a cada 24 horas, à retirada de amostras para determinação dessa atividade, a qual é expressa em unidades MWU.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1, estão indicados os resultados das determinações da atividade enzímica de *A. oryzae*, em função de carboidrato do meio de cultura e os dias de incubação.

Quadro 1. Atividade enzímica de *Aspergillus oryzae* 38b, ATCC 11601, CTPTA 13, em MWU, segundo a fonte de carboidrato do meio de cultura e durante 8 dias de incubação.

Fonte de carboidrato	DIAS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Amido	28	545	545	1.200	1.500	2.000	2.300	2.300
Amido hidrolisado	50	430	443	1.200	1.500	2.000	2.300	2.300
Lactose	25	1.200	1.200	1.500	2.000	3.000	3.100	3.100
Dextrose	-	187	250	400	600	800	1.500	1.600
Maltose	55	600	600	855	1.000	1.200	1.200	1.300

Conforme pode ser visto pelos dados do Quadro 1, o meio de cultura contendo lactose como fonte de carboidrato, induziu, já nas primeiras 48 horas de fermentação, o microrganismo à produção de alta atividade enzímica em alfa-amílase, além de manter, até o final da fermentação, uma maior atividade, comparativamente aos outros carboidratos estudados.

Conclui-se, portanto, que o melhor meio de cultura, em relação à fonte de carboidrato para indução do ênzimo alfa-amílase, é aquele que contém lactose.

LITERATURA

1. BECKHORN, E. J. Production and use of microbial enzymes for food processing. Jour. Agric. Food Chem. 13: 30, 1965.

2. LE MENSE, E. H. Production of mold amylase in submerged culture. Jour. Bacteriology 54: 149, 1947.

3. TSUCHIYA, H. M. Production of mold amylase in submerged culture. Cereal Chemistry 27: 322, 1950.

INFLUÊNCIA DO NITROGÊNIO ORGÂNICO SÔBRE A PRODUÇÃO DE ALFA-AMILASE FÚNGICA

Y. K. Park

RESUMO

É de suma importância nas fermentações enzímicas, o estudo da influência da fonte de nitrogênio orgânico na composição do meio de cultura, de maneira a induzir à formação de alta atividade enzímica.

Neste trabalho, foi estudada a produção do ênzimo alfa-amílase pelo microrganismo Aspergillus oryzae 386, ATCC 11601, CFPTA 133, num meio de cultura, cuja única variante era o nitrogênio orgânico. Das quatro diferentes fontes de proteína empregadas, a caseína hidrolisada e a vinhaça sêca de destilaria de cereais foram as que deram os melhores resultados, ambas com os valores de 1.720 MWU de atividade enzímica em alfa-amílase, após 7 dias consecutivos de incubação (168 hl). As duas fontes protéicas acima referidas, por serem constituídas de proteínas em forma molecular mais degradada, são, como é óbvio, mais rapidamente assimiláveis pelo microrganismo do ênzimo.

SUMMARY

INFLUENCE OF ORGANIC NITROGEN ON THE PRODUCTION OF FUNGAL α-AMYLASE. *Production of α-amylase by submerged fermentations with* Aspergillus oryzae, 386, ATCC 11601 *was attempted.*

Various nitrogen sources for culture media was examined, and found that hydrolized casein and dried distillate were best nitrogen source.

INTRODUÇÃO

Nas fermentações que se destinam especialmente à produção de ênzimos, as fontes de nitrogênio orgânico são de grande importância. Este trabalho teve por finalidade determinar um meio de cultura em que a fonte de nitrogênio orgânico fôsse a mais econômica, além de propiciar maior indução à atividade enzímica.

MATERIAL E MÉTODO

Utilizou-se, para o estudo, *Aspergillus oryzae* 38b, ATCC 11601, CTPTA 13.

O meio de cultura básico utilizado era constituído de:

	%
Amido solúvel	5
Nitrogênio orgânico	1,5
Fosfato monobásico de potássio	0,1

As variações na composição dos meios de cultura referem-se tão sòmente ao nitrogênio orgânico, tendo sido selecionadas quatro diferentes fontes como segue:

1. Caseína hidrolisada
2. Caseína não hidrolisada
3. Vinhaça sêca de destilaria de cereais
4. Peptona

Foram usados Erlenmeyer de 500 ml contendo cada um 200 ml do meio de cultura apropriado. Uma vez adequadamente tamponados, foram esterilizados em autoclave à temperatura de 121°C durante 30 minutos. Após

resfriamento à temperatura ambiente, procedeu-se à inoculação com o microrganismo em referência, segundo a técnica apropriada.

A incubação foi executada à temperatura ambiente, em um agitador rotativo a 100 r.p.m., durante 7 dias consecutivos (168 h).

Para avaliação da atividade enzímica, foram retiradas, a cada 24 horas, amostras para a determinação da atividade enzímica, que é expressa em unidades NWU.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 são mostrados os valores de atividade enzímica, em MWU obtidos de *A. orizae* incubado em meios de cultura com diferentes fontes de proteína e durante o período de 7 dias.

Quadro 1.

Fontes de proteína	DIAS					
	1	2	3	4	5	6	7
Caseína hidrolisada	-	375	500	1.000	1.550	1.720	1.720
Caseína não hidrolisada	-	168	220	400	600	700	700
Vinhaça sêca de destilaria de cereais	-	430	500	1.050	1.500	1.720	1.720
Peptona	-	-	-	-	-	-	-

Os dados do Quadro 1 mostram que existe uma grande influência da composição da fonte de nitrogênio orgânico do meio de cultura na indução enzímica. Como pode ser observado, no meio de cultura que continham

caseína hidrolisada ou vinhaça sêca de destilaria de cereais, as atividades enzímicas obtidas foram mais altas, demonstrando que a proteína ou o nitrogênio orgânico se encontrava sob uma forma mais degradada, portanto, mais fàcilmente assimilável pelo microrganismo.

No caso do nitrogênio orgânico ser representado pela peptona, observa-se que o pH do meio de cultura aumentou gradualmente dia a dia, até o valor pH 8,0, o que inibiu a formação da alfa-amílase. A razão deste fato é de não haver no meio de cultura tampão suficiente para o equilíbrio do pH. Ao contrário, nos meios de cultura que continham as outras três fontes de nitrogênio orgânico, o pH não aumentou, permanecendo estacionário ao redor do valor de 6,0.

Conclui-se, dêsse estudo, que os melhores meios de cultura com fonte de nitrogênio orgânico para a indução de alfa-amílase, são os que contêm caseína hidrolisada ou vinhaça sêca de destilaria de cereais, sendo esta última a preferida, por ser econômicamente mais barata.

LITERATURA

1. BECKHORN, E. J. Production and use of microbial enzymes for food processing. Jour. Agri. Food Chem. 13: 30, 1965.

2. LE MENSE, E. H. Production of mold amylase in submerged culture. Jour. Bacteriology 54: 149, 1947.

3. TSUCHIYA, H. M. Production of mold amylase in submerged culture. Cereal Chemistry 27: 322, 1950.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/70

ESTUDO DA ATIVIDADE DE ALFA-AMÍLASE POR DIVERSOS MICRORGANISMOS

Y. K. Park

RESUMO

O ênzimo alfa-amílase é produzido por várias espécies e linhagens de microrganismos. Neste trabalho, foi investigada a atividade enzímica de vários microrganismos, com a finalidade de prosseguir o estudo original apenas com a linhagem que apresentasse a maior atividade enzímica. A incubação foi feita em Erlenmeyer de 500 ml, à temperatura ambiente, em agitador rotativo a 100 r.p.m., durante 6 dias consecutivos (144 h). A cada 24 horas foram retiradas amostras para a determinação da atividade enzímica no líquido original, indicada em unidades MWU.

Dos 17 microrganismos testados neste trabalho, foram selecionados apenas quatro, sendo o Aspergillus orizae *NRRL 659 e 337, CTPTA 16, com a atividade enzímica de 1.500 MWU, induzidas em 48 h de incubação, o que apresentou maior atividade enzímica.*

SUMMARY

STUDY OF ALFA-AMYLASE ACTIVITY BY SEVERAL MICROORGANISMS. *Production of α-amylase for 17 strains of Fungus and found that* Aspergillus oryzae *NRRL 659 and* Aspergillus niger *NRRL 337 have produced large amount of enzyme.*

INTRODUÇÃO

Com o objetivo de investigar a atividade enzímica em alfa-amílase por microrganismos, foram testadas linhagens de um fungo e de duas bactérias da coleção do Instituto Zimotécnico de Piracicaba; uma linhagem de fungo do IAM do Japão - Universidade de Tóquio, uma linhagem do ATCC, Rockville E.U.A., e 12 linhagens NRRL, de Peoria, E.U.A.

MATERIAL E MÉTODO

Neste trabalho foram testados vários microrganismos que constam do subprojeto original.

Neste trabalho foi usado um meio de cultura considerado completo, segundo a literatura consultada, cuja composição é a seguinte:

Componentes

Farinha de soja	1,85
Vinhaça sêca de destilaria de cereais	0,80
Caseína hidrolisada	0,50
Levedura de cervejaria autolisada	0,20
Lactose	4,75
Sulfato de magnésio	0,04

Foram usados Erlenmeyer de 500 ml, contendo 200 ml do meio de cultura acima referido.

Uma vez adequadamente tamponados, foram esterilizados em autoclave à temperatura de 121°C durante 30 minutos.

Após resfriamento à temperatura ambiente, procedeu-se à inoculação.

A partir dos tubos contendo a cultura pura (estoque) dos microrganismos, com a técnica apropriada foram inoculados os meios de cultura, que receberam individualmente um ml da suspensão de espórios vegetativos de cada microrganismo testado. A incubação foi executada à temperatura ambiente, em um agitador rotativo a 100 r.p.m., durante 6 dias (114 h).

Para avaliação da atividade enzímica, retiraram-se, a cada 24 horas, amostras para a determinação da atividade enzímica, executada segundo o método padronizado na U.P.D. do C.T.P.T.A. (Projeto 114), sendo os resultados expressos em unidades M.W.U.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quadro 1. Em resultados MWU

Linhagens	DIAS 1	2	3	4	5	6
CTPTA 1	s.a.	-	3	4	5	6
CTPTA 2	-	-	-	-	-	-
CTPTA 3	-	-	-	-	-	-
CTPTA 4	-	-	-	-	-	-
CTPTA 5	214	372	335	570	630	630
CTPTA 6	-	-	-	-	-	-
CTPTA 7	-	-	-	-	-	-
CTPTA 8	-	-	-	-	-	-
CTPTA 9	-	-	-	-	-	-

(continua)

(continuação)

CCTPHAA 100	—	—	5344	6644	6000	6000
CCTPHAA 111	—	667	1500	1600	1522	1522
CCTPHAA 122	—	—	—	—	—	—
CCTPHAA 133	1700	5000	8550	7000	6000	6000
CCTPHAA 144	—	—	—	—	—	—
CCTPHAA 155	735	3735	6000	3000	3000	3000
CCTPHAA 166	3322	11500	7550	4000	4000	4000
CCTPHAA 177	—	—	—	—	—	—

Como pode ser observado pelos dados do Quadro 11, somente 6 linhagens de fungos produziram resultados significativos em atividade enzimática, dos quais apenas os quatro seguintes microrganismos serão considerados:

Aspergillus wamii IAM 22866, CCTPHAA 55, com 6300 MWU após 1200 h de incubação.

Aspergillus oryzae 3300 ATCC 11601, CCTPHAA 133, com 8850 MWU após 722 h de incubação.

Aspergillus niger NRRL 3300, CCTPHAA 155, com 6000 MWU após 722 horas de incubação.

Aspergillus niger NRRL 3337, CCTPHAA 166, com 1.5000 MWU após 488 h de incubação.

Segundo os dados do Quadro 11, existe uma relação significativa entre a linhagem de microrganismo e o tempo de geração máxima do enzima.

Pode-se, ainda, verificar que, após ter alcançado maior índice em atividade enzimática, essa atividade decresce, mas horas subsequentes, significando, provavelmente, que esse fato é devido a uma modificação ou degradação na estrutura molecular do próprio enzima formado.

Conclui-se que a melhor linhagem do fungo *Aspergillus niger* para produção de alfa-amílase, dentre tôdas aquelas testadas foi a NRRL 337 (CTPTA 16), que após 48 h de incubação, apresentou um valor de atividade enzímica de 1.500 MWU.

LITERATURA

1. HAYMES, W. C. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. Appl. Microbiology 3: 361, 1955.

2. LE MENSE, E.H. Production of mold amylases in submerged culture. Jour. Bacteriology 54: 149,1947.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/1970

OBTENÇÃO DE PRODUTO DE MANDIOCA SUBSTITUTO DA RASPA

Policarpo Vitti

RESUMO

O estudo realizado visou o melhoramento no processamento da mandioca para obtenção de um produto desidratado que tivesse melhor densidade do que a raspa de mandioca além de mostrar pouca variação nas propriedades físicas e na composição química.

Nos ensaios, as raízes foram cortadas em cubos e submetidas aos tratamentos com ácido ascórbico e ácido benzóico, ou à combinação de ambos os ácidos.

Executaram-se, ainda, ensaios nos quais os cubos não foram submetidos a qualquer tratamento, ou apenas foram prensados antes da secagem.

Os resultados mostraram que os melhores produtos foram obtidos de cubos não tratados ou apenas prensados. Neste último caso, a secagem processou-se de maneira mais rápida do que nos demais experimentos.

SUMMARY

A SUBSTITUTE FOR MANIOC CHEAPS. *The aim of this work has been to improve manioc processing in order to get a dehydrated cube with better density and with no variation on its physical or chemical characteristics.*

Manioc roots were cut in cubes which to turn were submitted to acid solution treatments, with ascorbic acid, benzoic acid or both combined. One sample was also prepared without any treatment. A further sample was also obtained by submitting manioc cubes to processing actions.

Results shaved that best products were obtained from manioc cubes without any treatment as well as cubes obtained from pre-sing action. In this latter case dehydration time was shorter than the former.

INTRODUÇÃO

O presente trabalho consistiu em estudos relativos ao processamento de raízes de mandioca na forma de cubos desidratados, visando a obtenção de um produto substituto da raspa.

Como se sabe, a obtenção de raspa de mandioca é um processo bastante moroso, que dá, além do mais, um produto bastante irregular. Em conseqüência, o desenvolvimento de qualquer processo que econômicamente possa substituir ao da obtenção da raspa, é de interêsse nacional. Em vista disso, procurou-se reduzir, ao máximo, o tempo de processamento para obtenção de um produto que apresentasse características físico - químicas bastante próximas daquelas da raspa de mandioca.

MATERIAL E MÉTODO

A matéria-prima utilizada nos trabalhos era constituída de raízes de mandioca da variedade Branca de Santa Catarina, provenientes de Mogi-Mirim. A idade das raízes situava-se entre 18 e 20 meses e, portanto, no ponto ideal para processamento. As amos -

tras foram processadas o mais rápidamente possível, para evitarem-se alterações nas raízes e, conseqüentemente, no próprio produto. Para isso, as raízes foram imediatamente lavadas, picadas e descascadas, retirando-se apenas a película marrom externa. O esquema de processamento foi o seguinte:

Pesagem das raízes
↓
Lavagem
↓
Descascamento
↓
Corte em cubos
↓
Tratamento com solução de ácido + hidróxido de soda, a 45°C, durante 15-20 segundos
↓
Secagem em secador de ar quente com circulação forçada de ar (Temperatura descendente de 90°C a 60°C)

Os tratamentos pesquisados foram:

a) Solução de ácido benzóico 0,5% + hidróxido de sódio 0,1%;

b) Solução de ácido ascórbico 0,5% + hidróxido de sódio 0,1%;

c) Solução de ácido benzóico 0,5% + ácido ascórbico 0,5% + hidróxido de sódio 0,1%.

Um teste foi feito com esquema de processamento idêntico ao anterior, mas sem a fase de tratamento, isto é, com os cubos indo diretamente para a secagem.

Outro ensaio foi realizado, segundo o esquema de processamento seguinte:

Pesagem das raízes

↓

Lavagem

↓

Descascamento

↓

Corte em cubos

↓

Prensagem, utilizando-se de prensa hidráulica com pressão de 250 a 300 kg/m^2 até redução da umidade do material a 40%

↓

Secagem em secador de ar quente com circulação forçada de ar à temperatura ascendente (40-60°C)

Os cubos desidratados obtidos foram utilizados para ensaios de preparo de farinha. Para isso, moeu-se o material em moinho de laboratório "Miag". O material moído foi passado por jôgo de peneiras do tipo 8xx (0,180mm), obtendo-se, assim, a farinha.

Análises físico-químicas

Densidade. Determinou-se a densidade dos cubos pela medição do volume ocupado por 100, 200, 300, 400 gramas de amostra. O resultado é a média dos quatro valôres obtidos.

Características externas. Determinaram-se as características externas dos cubos por observação visível do seu aspecto (uniformidade) e coloração.

Características viscográficas. As características viscográficas das amostras foram determinadas em aparelho Amilógrafo-Viscógrafo "Brabender", utilizando-se 8% de amostra sêca em estufa. A temperatura inicial do aparelho foi ajustada para 25°C e a taxa de aumento da temperatura do aparelho foi de 1,5°C por minuto. Deixou-se o aparelho funcionando até a temperatura atingir 92°C, mantendo-o neste ponto durante 20 minutos, após o que a temperatura foi abaixada para 50°C. Os pontos mais importantes da curva viscográfica foram assim registrados.

Umidade, cinzas, fibras, amido, matéria graxa e proteínas

Foram determinados pelos processos usuais.

O teor de ácido ascórbico foi determinado por titulação com 2,6 diclorofenolindofenol sódico.

Os componentes minerais das cinzas foram determinados por titulação com complexo GDTA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, serão discutidos os resultados relativos à parte de processamento, para depois complementar-se com as análises físico-químicas dos produtos.

Os dados do Quadro 1 mostram os rendimentos em cubos secos (em média, a umidade variou de 8,62 a 10,38%), com média padronizada a 10%.

Quadro 1. Pendimento em cubos processados (umidade = 10%).

Tratamentos	Rendimento em %
AA (ácido ascórbico)	37,0
AB (ácido benzóico)	35,8
AA + AB (ácido ascórbico + ácido benzóico)	38,5
ST (sem tratamento)	36,0
P (prensado)	34,0
R (raspa) (*)	32,0

(*) A raspa foi incluída para têrmo de comparações. Essa raspa foi obtida industrialmente e é da mesma variedade de mandioca.

Na maioria dos casos a quantidade total das raízes processadas foi de 20 quilos. Com essa quantidade pode-se secar, simultanêamente, dois tratamentos diferentes.

Os resultados das análises químicas da matéria-prima (raízes de mandioca - variedade Branca de Santa Catarina) podem ser vistos no Quadro 2.

Quadro 2. Composição química das raízes da mandioca, variedade Branca de Santa Catarina.

Componentes	Composição química	
	Matéria original	Matéria sêca
Umidade	%	%
Umidade	59,13	-
Amido	33,58	82,16
Proteína	1,80	4,40
Açúcares totais	3,18	7,78
Açúcares redutores	0,97	2,37
Fibra	0,75	1,83
Cinzas	0,41	1,01
Cálcio (mg/100 g)	19,80	48,4
Magnésio (mg/100 g)	63,20	184,6
Ferro (mg/100 g)	traços	-
Fosfato (mg PO_4/100 g)	62,50	153,0

A análise física dos cubos, ou seja, a densidade das amostras, assim como seu aspecto externo, são mostrados no Quadro 3, que inclui, também, uma amostra de "pellets" de mandioca a título de comparação.

Quadro 3. Densidade e aspecto externo dos cubos de mandioca , variedade Branca de Santa Catarina.

Tratamentos	Densidade g/cm^3	Coloração
AA	0,44	Branco - amarelado
AB	0,46	Branco - amarelado
AA + BB	0,45	Branco - rosado
ST	0,46	Branco levemente amarelado
Prensado	0,45	Branco levemente amarelado
Raspas	0,40	Branco - marrom
"Pellet"	0,51	Branco com pintas escuras

Os valôres ou índices de pH e acidez das amostras de cada tratamento podem ser vistos no Quadro 4.

Quadro 4. Acidez e pH das amostras de cada tratamento.

Tratamentos	Acidez (ml NaOH N310	pH
AA	2,3	6,1
AB	2,3	6,0
AA + AB	4,8	5,3
ST	2,3	6,1
Prensado	2,4	6,0
Raspas	2,8	5,9

Em relação, ainda, à análise física, os dados do Quadro 5 mostram as características viscográficas das amostras, correspondentes a cada tratamento estudado.

Quadro 5. Características viscográficas das amostras de cada tratamento.

Amostra	Tg °C	Mg min	Vm U.B.	Mvm min	Vr U.B.	Ve U.B.	Mvm-Mg min	Vm-Vr U.B.	Ve-Vr U.B.
Raspa	66	27	580	41	280	360	14	300	80
AA	65	26	660	33	220	240	17	420	20
AB	66	26	600	33	220	240	7	360	20
AA + AB	64	30	570	37	230	260	7	310	30
ST	65	26	620	36	260	280	10	340	20
Prensado	65	26	680	36	420	430	10	260	10

Tg - Temperatura de gelatinização (em graus centígrados).

Mg - Tempo para atingir a temperatura de gelatinização (minutos).

Vm - Viscosidade máxima (U.B. unidades Brabender).

Mvm - Tempo para atingir a viscosidade máxima (minutos).

Vr - Viscosidade após 20 minutos a 92°C (U.B.).

Ve - Viscosidade na temperatura de 50°C (U.B.).

Mvm - Mg - Facilidade de cozimento da amostra.

Vm - Vr - Estabilidade do amido

Ve - Vr - Índice de gelatinização.

Os dados correspondentes às análises químicas dos cubos, segundo os tratamentos estudados, são aqueles contidos no Quadro 6.

Quadro 6. Composição química dos cubos de mandioca da variedade Branca de Santa Catarina.

Determinações	TRATAMENTOS											
	S.T.		A.B.		A.A.		A.A. + A.B.		Raspa		Prensado	
	M.B.	M.S.	M.B.	M.S.	M.B.	M.S.	M.B.	M.S.	M.B.	M.S.	M.B.	M.S.
Umidade %	9,38	-	8,62	-	9,22	-	9,71	-	10,38	-	10,31	-
Proteína %	2,47	2,72	2,12	2,32	1,95	2,14	1,95	2,15	2,65	2,95	2,12	2,36
Materia graxa %	0,53	0,58	0,49	0,53	0,39	0,42	0,54	0,54	0,36	0,40	0,41	0,45
Amido %	79,93	88,20	80,04	87,59	78,82	86,82	79,71	88,80	75,49	84,23	77,71	86,64
Dextrina %	0,32	0,36	0,73	0,80	0,48	0,53	0,89	0,99	0,36	0,40	0,26	0,29
Fibras %	1,81	1,99	1,68	1,83	1,78	1,96	1,88	2,08	1,97	2,19	2,10	2,34
Cinzas %	1,09	1,20	1,16	1,26	1,11	1,22	1,18	1,30	0,78	0,82	1,07	1,19
Ácido benzóico mg/100 g	-	-	20,3	22,2	-	-	42,7	47,0	-	-	-	-
Ácido ascórbico mg/100 g	-	-	-	-	132,6	146,0	115,8	128,2	-	-	-	-

Como foi antes referido, fizeram-se alguns testes de obtenção de farinha a partir dos cubos.

Os dados de rendimento de farinha, em laboratório, correspondentes a cada tratamento, inclusive das raspas, são mostrados no Quadro 7.

Quadro 7. Rendimento em farinha dos cubos, de mandioca da variedade Branca de Santa Catarina, segundo os tratamentos.

Tratamentos (*)	Passou por peneira 8xx	Retido	Perda
	%		
S.T.	73,27	25,50	1,23
Prensado	63,23	36,14	0,43
AA + AB	72,79	26,57	0,64
AA	67,58	31,67	0,75
AB	74,98	24,38	0,63
Raspa	75,87	23,91	0,20

(*) Utilizaram-se, em média, para a moagem, 1.500 g de material.

Os resultados das determinações de acidez e pH da farinha obtida podem ser vistos no Quadro 8.

Quadro 8. Acidez e pH da farinha de mandioca da variedade Branca de Santa Catarina, segundo os tratamentos.

Amostra	pH	Acidez
AA + AB	5,3	3,4
ST	5,9	2,6
AA	5,8	2,6
AB	5,7	2,6
Raspa	5,8	2,8
Prensado	5,8	2,8

Igualmente como para os cubos, foi feito o estudo do comportamento viscográfico das farinhas, cujos resultados podem ser vistos no Quadro 9.

Quadro 9. Comportamento viscográfico das farinhas obtidas a partir dos cubos.

Amostra	Tg °C	Mg min	Vm U.B.	Mvm min	Vr U.B.	Ve U.B.	Mvm-Mg min	Vm-Vr U.B.	Ve-Vr U.B.
Raspa	65	27	920	32	360	520	5	560	160
AA	65	26	970	37	260	340	11	710	80
AB	65	26	980	32	290	430	6	690	140
AA + AB	64	25	920	30	210	280	5	710	70
ST	65	26	950	34	260	350	8	690	90
Prensado	65	27	980	34	370	580	7	610	210

Como pode ser visto pelas análises da matéria-prima (Quadro 2), as raízes contêm um elevado teor de umidade, que ultrapassa de 50%. Um dos problemas, portanto, quando se deseja obter um produto seco, é o da eliminação de todo êsse teor de umidade. Nos processos industriais comuns de preparo da raspa de mandioca, dispende-se um tempo de secagem ou desidratação excessivamente longo (12 a 15 horas), o que pode prejudicar a qualidade do produto.

A finalidade dos ensaios aqui relatados foi a de estabelecer um processo, no qual êsse tempo de secagem fôsse bastante reduzido. No processamento dos cubos, o tempo de secagem ficou reduzido para duas horas e meia, no máximo.

Do ponto-de-vista de processamento, observa-se pelos dados do Quadro 1, relativos aos rendimentos, que houve pouca diferença em relação à raspa. De modo geral, o rendimento, em cubos, variou em tôrno de 36%

o que corresponde a um rendimento ligeiramente superior ao da raspa, que é de 32%. Êsses valôres, entretanto, podem ser considerados como similares, tendo-se em conta que o rendimento de raspa é industrial, ao passo que o de cubos é em escala-piloto.

Ainda em relação à parte de processamento, foi notória a diminuição de secagem dos cubos comparativamente ao de raspas. Nas amostras correspondentes aos tratamentos AA, AB, AA + AB e ST, o tempo de secagem foi de duas horas e meia, enquanto que, para os cubos prensados, evidentemente, o tempo foi reduzido para uma hora e meia. O ciclo de secagem utilizado no primeiro caso foi de 1/2 hora a 90ºC, 1/2 hora a 80°C, 1/2 hora a 70°C e 1 hora a 60°C. No caso do material prensado, o ciclo de secagem foi de 1 hora a 45°C e 1/2 hora a 60°C.

Como resultante da secagem, pode ocorrer, no caso da mandioca, o aparecimento de dextrinas, que escurecem o produto. Por isso também foi determinado o conteúdo de dextrina dos cubos, e pelos valôres contidos no Quadro 6, relativos à composição química, nota-se que os materiais submetidos a tratamento apresentaram maiores teores de dextrina, ao passo que foram menores nas amostras não tratadas e prensadas. As raspas apresentaram um teor ligeiramente superior a estas.

Em relação à composição química (Quadro 6), observa-se que não houve muita diferença entre as diversas amostras, a não ser quanto aos teores de ácido ascórbico e ácido benzóico, que foram, evidentemente, encontrados nas amostras submetidas ao tratamento com as respectivas soluções.

O aspecto externo dos cubos, no caso das amostras tratadas com a mistura de ácido benzóico e ácido ascórbico, ficou bastante alterado, mostrando-se de coloração rosada. Nesse sentido, as melhores amostras foram aquelas sem tratamento (ST) e a prensada (P).

Uma característica física importante do produto é a sua densidade, expressa em gramas/cm^3. Isto é útil no caso de exportação, uma vez que se pode colocar maior ou menor quantidade de material, num mesmo volume.

Os valôres de densidade obtidos (Quadro 3) para as amostras tratadas, prensadas e sem tratamento, foram superiores aos das raspas. Em quilos, por exemplo, a amostra sem tratamento (ST) deu um valor de densidade de 60 quilos a mais por metro cúbico do que a raspa. No Quadro 3, cita-se, ainda, o valor para os "pellets", a título de comparação.

Ainda em relação às características físicas das amostras, foram determinadas as curvas viscográficas correspondentes. Em geral, estas foram de características semelhantes às do amido de mandioca. Evidentemente, os valôres de viscosidade foram mais baixos, pois que não se estava trabalhando com amido puro. Dos valôres afetados pelo tratamento (Quadro 5), teve-se um pico de viscosidade máximo mais baixo no caso da amostra tratada com a mistura de ácido ascórbico e ácido benzóico (AA + AB), o que era de se esperar, pois, a acidez abaixa esse valor. Outro valor afetado da curva, foi o índice de viscosidade após 20 minutos à temperatura de 92°C (Vr). O que ocorre é uma alteração na viscosidade ou a perda de estabilidade do gel. Observa-se que a quebra foi maior nas amostras AA, AB, AA + AB, o que também já era de se esperar.

Ainda em relação aos valôres da curva viscográfica, e considerando-se os valôres de pH e acidez das amostras (Quadro 5), observa-se que as amostras tratadas com a combinação dos ácidos tiveram menor pico de viscosidade máxima. O mesmo ocorreu com a raspa, cuja acidez era bastante elevada.

Uma relação mais aprofundada entre as características viscográficas, composição química, acidez e pH, é assunto bastante complexo, que não pode, portanto, ser cogitado na presente discussão.

Como foi visto, os cubos obtidos no processamento foram ainda moídos e peneirados, conseguindo-se uma farinha bastante fina, que também foi submetida ao estudo do comportamento viscográfico. Os resultados alcançados (Quadro 9), são praticamente comparáveis aos obtidos das amostras que lhes deram origem. É lógico que os picos de viscosidade máxima foram maiores, mas isso é perfeitamente normal, porque a farinha é mais pura em amido, sabendo-se que êsse valor tende a crescer com o aumento na concentração de amido puro. É de se notar que, novamente, as amostras AA + AB e a raspa tiveram os menores picos de viscosidade máxima, relacionando-se, outra vez, com os valôres de acidez a pH das farinhas (Quadro 8).

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, alguns pontos ficaram evidenciados, tais como:

a) O tratamento dos cubos de mandioca não resultou em economia do tempo de secagem, quando comparado ao de cubos sem tratamento;

b) O corte das raízes de mandioca em cubos e a sua secagem a temperaturas decrescentes de desidratação, trouxe economia no tempo de secagem, quando comparado ao da raspa de mandioca;

c) Os cubos sem tratamento e prensados, deram produtos de melhor coloração, do que aqueles tratados;

d) A densidade dos cubos foi maior do que a de raspa;

e) O sistema de prensagem dos cubos reduz, evidentemente, o tempo de secagem, mas introduz uma etapa a mais no processamento, além de provocar leve depreciação no aspecto externo do produto final.

LITERATURA

1. UNCTAD-GATT. The markeys for manioc as a raw material for compound animal feedingstuffs. Geneva, 1968.

2. WHISLER-PASCHOLL. Starch Chemistry and Technology Vol. II. Industrial aspects. Academic Press, New York & London, 1967.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/1970

ARMAZENAMENTO DE FEIJÃO-DE-MESA (*)

Braz Antonio Jordão
Sergio Roberto Stolf

RESUMO

Até o presente, muito pouco estudo existe sôbre a conservação do feijão-de-mesa, de modo a êle poder ser não apenas preservado em suas qualidades, como bem aceito pelos consumidores, após períodos relativamente prolongados de armazenamento.

Se uma umidade excessiva, além de certa faixa, pode provocar a deterioração do produto, por outro lado, em condições muito sêcas, no caso de manuseio a granel pouco cuidadoso, os grãos poderão trincar-se, com tendência a quebrar, ou, no cozimento, certa proporção dêles de separar-se ao meio. Neste último caso, ainda que apresentem suas qualidades originais organolépticas ou químicas, não serão aceitos pelos consumidores.

Há um teor de umidade ideal para o feijão, a qual lhe pode assegurar boas condições de preservação das qualidades e boa aceitação por parte dos consumidores, mesmo quando armazenado por períodos prolongados.

A conservação do teor de umidade do produto depende do sistema de acondicionamento ou do tipo de embalagem. Se hermético, o grau de umidade é satisfatòriamente preservado; caso contrário, aquela característica irá depender da umidade relativa reinante no ambiente.

(*) Colaboraram neste trabalho, os técnicos Ruth S. Garrutti, Eidiomar Angelucci e João S. Tango.

Nos ensaios sôbre conservação de feijão aqui relatados, dentro da faixa de 8 a 12% de umidade no grão, não foram observadas alterações sensíveis em relação ao pêso e ao volume específico do produto, mesmo após armazenagem durante cêrca de um ano e meio.

A acidez do óleo aumentou com o tempo de armazenamento, variando ligeiramente com o teor de umidade no grão, porém sem influir na qualidade do produto.

Dentro daquela faixa, a umidade não influiu sensìvelmente no grau de germinação das sementes dos tratamentos com diferentes teores de umidade. O mesmo foi verificado, quìmicamente, em relação aos componentes proteína, fibra, cinza, óleo, cálcio, ferro e fosfato.

Contudo, nas provas de degustação a preferência foi pelo feijão dos tratamentos que compreendiam maior grau de umidade.

Em todos os tratamentos com o produto devidamente ventilado, expurgado e bem acondicionado, verificou-se eficiente preservação contra o ataque pelos insetos específicos do feijão.

SUMMARY

DRY BEAN STORAGING. *At the present there are only a few studies on dry bean preservation, so it can not only be preserved on its qualities, but well accepted by the consumer after relatively long storage periods.*

If excessive humidity may cause a deterioration of the product, on the other hand, if it is too dry, the seed may crack and break easily or, when cooked, a good percentage may break in half. In this case, even if it has conserved its original organoleptics and chemical qualities, it will not be accepted by the consumer.

There is an ideal humidity content for beans, that preserves its qualities and makes it very well accepted by the consumers, even after long storage periods.

The humidity content conservat on depends on the conditioning system or the kind of packaging. The humidity is conserved if the packaging is hermetic, but if it is not, this caracteristic will depend on the relative humidity of the storaging place.

We did not notice any sensible changes on the specific weight and volume of the product on our researches with seeds that had 8 to 12% humidity, even after the storaging for a year and a half.

The acidity of the product increased with the storaging period, varying slightly with the seeds humidity content, although it did not influence the product quality.

The humidity, within this limit, did not make any sensible changes on the germination degree among the treatments with different humidity contents. The same results were found on the chemical analysis on protein, fiber, ash, oil, calcium, iron and fosfate.

On the sensorial analyses, the preferred beans were those that had a greater humidity percentage.

In all treatments, there was an efficient preservation against insects.

INTRODUÇÃO

Constituindo o feijão um dos alimentos básicos da mesa do brasileiro, o estudo de seu armazenamento passa a ser tão importante quanto o da sua produção.

Na maioria dos outros países, entretanto, o feijão não é um alimento básico, daí a escassez bibliográfica relativa ao seu estudo.

No Estado de São Paulo, os técnicos da Secretaria da Agricultura presentemente estudam a cultura

do feijoeiro, visando resolver o problema do baixo rendimento das lavouras e o fomento de seu plantio estadual. De fato, embora a cultura dessa leguminosa possa ser fomentada, concomitantemente com maior rendimento por área, através da escolha de zonas com climas mais propícios à instalação da cultura, do plantio de melhores variedades e do emprêgo de modernas técnicas agronômicas, urge resolver, também, o problema do armazenamento do produto colhido.

No armazenamento do feijão, sem um preparo preliminar relativo ao teor de umidade e ao sistema ou tipo de acondicionamento, o produto estará sujeito ao prematuro envelhecimento, ao perigo de reinfestação pelo caruncho e, até mesmo, quando muito úmido, à deterioração.

A conservação do feijão por tempo mais prolongado, mediante meios racionais de armazenamento que permitem manter suas qualidades naturais desejáveis ao consumidor mais exigente, eliminando, assim, a ação dos intermediários, constitui condição reguladora à estabilização de preços nas entressafras.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O feijão de mesa com teor de umidade acima de 13%, deteriora-se significativamente, em sabor e textura, com 6 meses de armazenamento a 25°C. Com 12 meses de armazenamento nessas condições, torna-se muito impalatável em sabor e textura, elevando-se muitas vêses, significativamente, o valor da acidez lipídica.

Existe correlação entre a baixa qualidade do feijão, indicada pelo sabor e textura, e o aumento no valor da acidez lipídica. Êsse aumento, durante o armazenamento, está relacionado com o teor de umidade (acima de 13%).

Não há diferença significativa no total de substâncias pécticas extraídas de feijões com alto e baixo teor de umidade (8,1-13,3%).

MATERIAL E MÉTODO

Matéria-prima

Amostras de feijão-de-mesa da variedade Rosinha, com teores iniciais de umidade de 8,08, 9,87 e 11,79% procedentes da Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico, foram empregadas para estudos dos seguintes meios de conservação, que tiveram a duração de 20 meses:

1. Em lata hermética
2. Em lata não hermética
3. Em saco de aniagem, em armazém
4. Em saco de aniagem, em câmara controlada
5. Em saco de papel multifoliado (5 fôlhas) Battes
6. Em saco de polietileno (005), acondicionado em caixa de papelão.

A cada quatro meses, em amostras de feijão de cada um dos tratamentos, foram procedidas as seguintes determinações:

Teor de umidade

Foi determinado em estufa comum, automática, a 100-110°C, durante 24 horas, em relação ao pêso úmido.

Pêso específico aparente

Determinou-se mediante pesagem de amostra de volume constante. O pêso específico aparente é dado pela relação entre pêso e volume.

Pêso específico real

A determinação dos volumes reais foi feita em proveta graduada, com água, mediante imersão de uma amostra de pêso constante. O pêso específico real é dado pela relação entre o pêso e o volume real.

Proteína

Determinada segundo o método Kjeldahl modificado.

Cinzas

Foram determinadas segundo o método oficial de análises da A.O.A.C., 1965.

Fibra e cálcio

Foram determinados pelos métodos descritos em Laboratoriumbuch Für Dem Lebensmittelchemiker Beythien.

Ferro (Fe^{++})

Determinou-se pelo método colorimétrico de análises.

Fosfato (PO_4^{---})

Determinado pelo método oficial de análises da A.O.A.C., 1965.

Acidez

Foi determinada pelo método oficial Ca-5a-40 da A.O.C.S.

Peróxido

Também pelo método oficial Ca-8-53 da A.O.C.S.

Análise sensorial

O Triangular com preferência, foi o empregado. Foram estudadas 20 amostras, conforme relacionadas abaixo:

Amostras estudadas Nº	Tipo de acondicionamento	Umidade inicial da amostra %
1	Lata hermética	11,79
2	" "	9,87
3	" "	8,08
4	Lata não hermética	11,79
5	" "	9,87
6	" "	8,08
7	Sacos plásticos	11,79
8	" "	9,87
9	" "	8,08
10	Sacos multifoliados	11,79
11	" "	9,87
12	" "	8,08
13	Sacos de aniagem em armazém	11,79
14	Sacos de aniagem em armazém	9,87
15	Sacos de aniagem em armazém	8,08
16	Sacos de aniagem em câmara controlada	11,79
17	Sacos de aniagem em câmara controlada	9,87
18	Sacos de aniagem em câmara controlada	8,08
19	Lata hermética	9,87
20	Lata não hermética	9,87

Exame entomológico

O exame entomológico do produto, foi feito pela Seção de Entomologia do Instituto Agronômico.

Teste de germinação

Realizado pelo Laboratório de Sementes da Seção de Botânica, do Instituto Agronômico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características físicas

1. Teor de umidade

No Quadro 1, estão indicados os teores médios de umidade determinados em amostras de feijão, correspondentes aos seis meios de conservação e aos cinco períodos de conservação estudados.

Os dados constantes do Quadro 1 permitem as seguintes conclusões, segundo o grau inicial de umidade do feijão.

a) Feijão com 11,79% de umidade inicial(Figura 1). Após 20 meses de armazenamento, a conservação do grau de umidade mais satisfatória do feijão, em média, foi verificada nos tratamentos correspondentes às latas hermética e não hermética, nas quais os teores de umidade do produto nelas acondicionado foram os que menos diferiram do teor inicial. Seguiram-se,pela ordem, os tratamentos sacos de polietileno, sacos de papel multifoliados, sacos de aniagem em armazém e sacos de aniagem em câmara controlada.

b) Feijão com 9,8% da umidade inicial (Figura 2). Os resultados mais satisfatórios na conservação do teor de umidade, durante os 20 meses de armazenamento, foram, em média, observados nos tratamentos sacos de aniagem em câmara controlada e lata hermética, que praticamente não mostraram alterações, seguindo-se daqueles correspondentes ao tratamento em lata não hermética. Os resultados menos satisfatórios foram constatados nos tratamentos sacos plásticos acondicionados em caixa de papelão, sacos de papel multifoliados e sacos de aniagem em armazém.

Quadro 1. Teores médios de umidade do feijão, em %, segundo os tratamentos de conservação e as épocas das determinações.

Tratamentos	Umidade	Épocas das determinações				
	inicial	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses
Saco de aniagem em câmara controlada	11,79	10,29	10,01	10,50	10,43	9,12
	9,87	9,99	9,76	10,21	10,35	8,92
	8,08	9,63	9,63	10,23	10,32	8,76
Saco de aniagem em armazém	11,79	10,76	12,12	12,34	13,64	12,99
	9,87	10,92	12,04	12,34	12,97	12,62
	8,08	10,28	12,14	12,02	12,78	12,55
Lata hermética	11,79	11,70	11,88	-	11,93	11,95
	9,87	9,97	10,06	10,15	9,97	9,63
	8,08	8,43	7,69	7,72	7,72	7,59
Lata não hermética	11,79	11,57	12,00	11,95	12,19	11,83
	9,87	10,29	10,46	10,55	10,55	10,38
	8,08	8,29	8,65	9,34	8,85	9,37
Saquinho de polietileno (005), em caixa de papelão	11,79	12,37	12,45	12,34	12,20	12,32
	9,87	10,50	10,75	10,68	11,14	11,27
	8,08	8,90	9,69	9,53	9,96	10,23
Saco de papel multifoliado (5 folhas) Battes	11,79	11,35	11,91	12,05	12,94	13,06
	9,87	10,59	11,86	12,21	13,23	12,90
	8,08	10,46	11,16	11,74	13,32	13,06

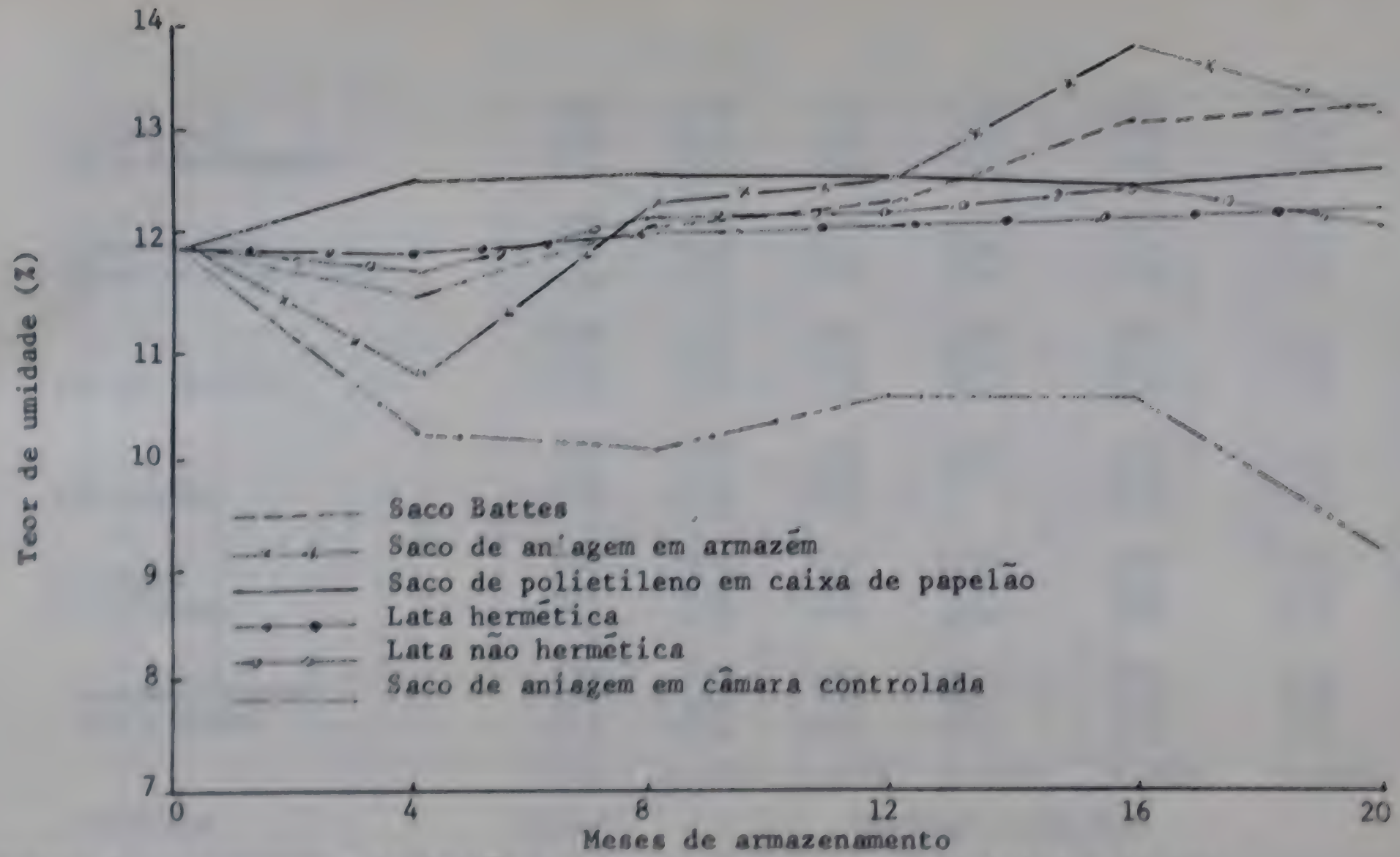


Figura 1. Armazenamento de feijão-de-mesa. Teor de umidade inicial = 11,79%

Quadro 2. Pesos específicos aparentes médios do feijão, em g/cm³, segundo os tratamentos e as épocas das determinações.

Tratamento	Umidade inicial	Épocas das determinações: Início	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses
Saco de aniagem em câmara controlada	11,79	0,754	0,750	0,768	0,758	0,758	0,749
	9,87	0,757	0,750	0,766	0,764	0,749	0,754
	8,08	0,763	0,749	0,759	0,758	0,753	0,759
Saco de aniagem em armazém	11,79	0,754	0,743	0,757	0,749	0,745	0,738
	9,87	0,757	0,738	0,749	0,742	0,737	0,737
	8,08	0,763	0,740	0,746	0,742	0,734	0,735
Lata hermética	11,79	0,754	0,757	0,759	-	0,748	0,753
	9,87	0,757	0,756	0,763	0,756	0,751	0,751
	8,08	0,763	0,762	0,768	0,769	0,762	0,764
Lata não hermética	11,79	0,754	0,734	0,752	0,750	0,743	0,742
	9,87	0,757	0,752	0,766	0,752	0,748	0,753
	8,08	0,763	0,755	0,768	0,764	0,760	0,750
Saco de polietileno em caixa de papelão	11,79	0,754	0,749	0,765	0,748	0,745	0,746
	9,87	0,757	0,747	0,764	0,750	0,748	0,749
	8,08	0,763	0,753	0,768	0,756	0,755	0,748
Saco de papel multifoliado	11,79	0,754	0,747	0,758	0,751	0,751	0,745
	9,87	0,757	0,746	0,756	0,748	0,738	0,744
Battes	8,08	0,763	0,749	0,754	0,744	0,741	0,741

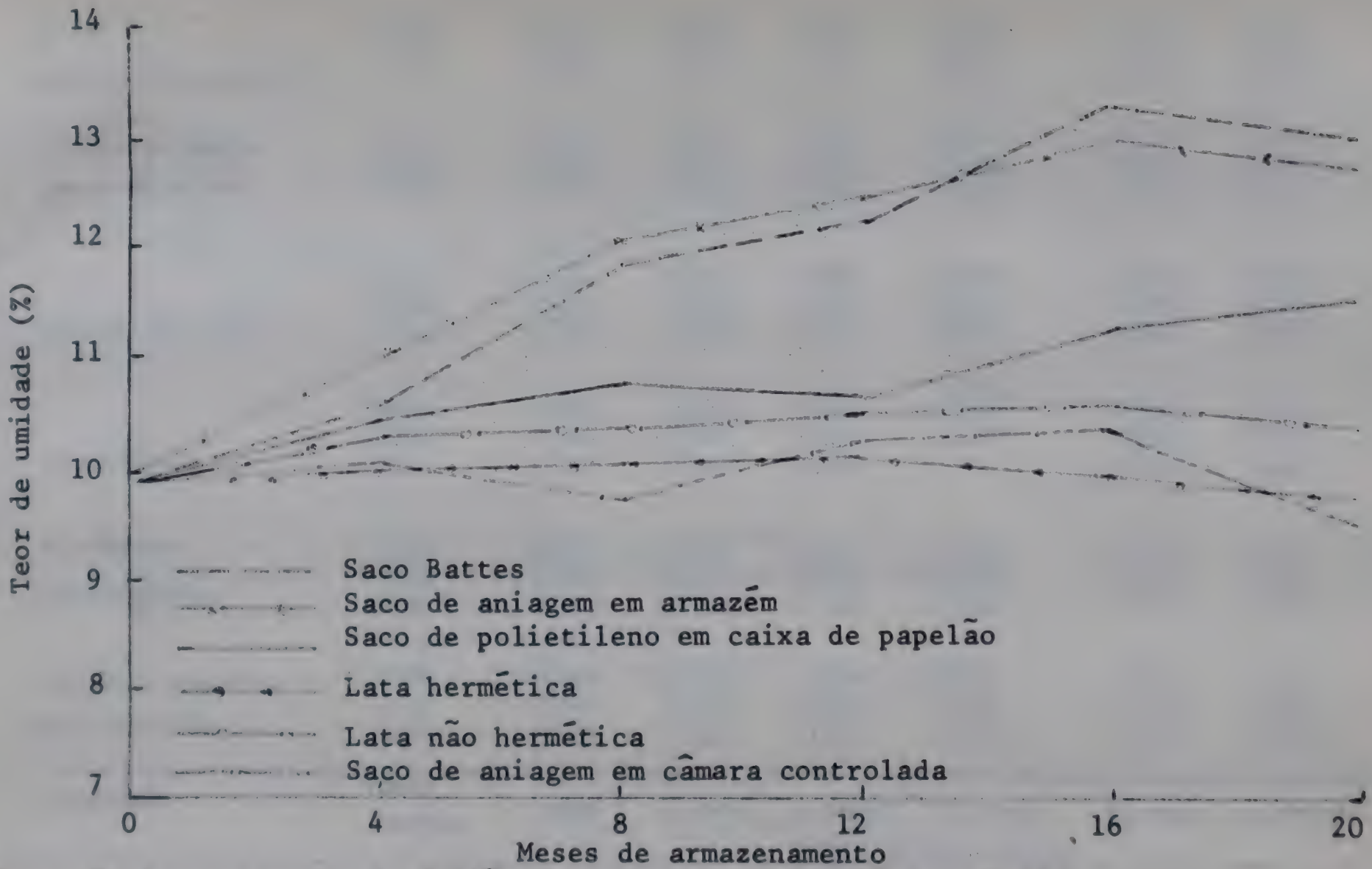


Figura 2. Armazenamento de feijão-de-mesa. Teor de umidade = 9,87%

Quadro 3. Pesos específicos reais médios do feijão, em g/cm^3, segundo os tratamentos e as épocas das determinações.

Tratamento	Umidade inicial	Épocas das determinações					
		Início	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses
Saco de aniagem em câmara controlada	11,79	1,286	1,287	1,256	1,267	1,273	1,324
	9,87	1,264	1,289	1,258	1,279	1,302	1,326
	8,08	1,271	1,288	1,258	1,276	1,299	1,311
Saco de aniagem em armazém	11,79	1,286	1,284	1,275	1,255	1,287	1,305
	9,87	1,264	1,277	1,279	1,251	1,272	1,314
	8,08	1,271	1,280	1,277	1,253	1,289	1,303
Lata hermética	11,79	1,286	1,289	1,267	-	1,272	1,310
	9,87	1,264	1,288	1,274	1,266	1,306	1,313
	8,08	1,271	1,294	1,281	1,267	1,328	1,328
Lata não hermética	11,79	1,286	1,275	1,261	1,256	1,264	1,304
	9,87	1,264	1,303	1,280	1,263	1,294	1,320
	8,08	1,271	1,296	1,285	1,273	1,326	1,319
Saco de polietileno em caixa de papelão	11,79	1,286	1,290	1,251	1,259	1,283	1,310
	9,87	1,264	1,298	1,266	1,269	1,287	1,322
	8,08	1,271	1,305	1,277	1,273	1,307	1,326
Saco de papel multifoliado (Battes)	11,79	1,286	1,280	1,268	1,261	1,275	1,312
	9,87	1,264	1,281	1,263	1,258	1,272	1,324
	8,08	1,271	1,297	1,270	1,257	1,288	1,293

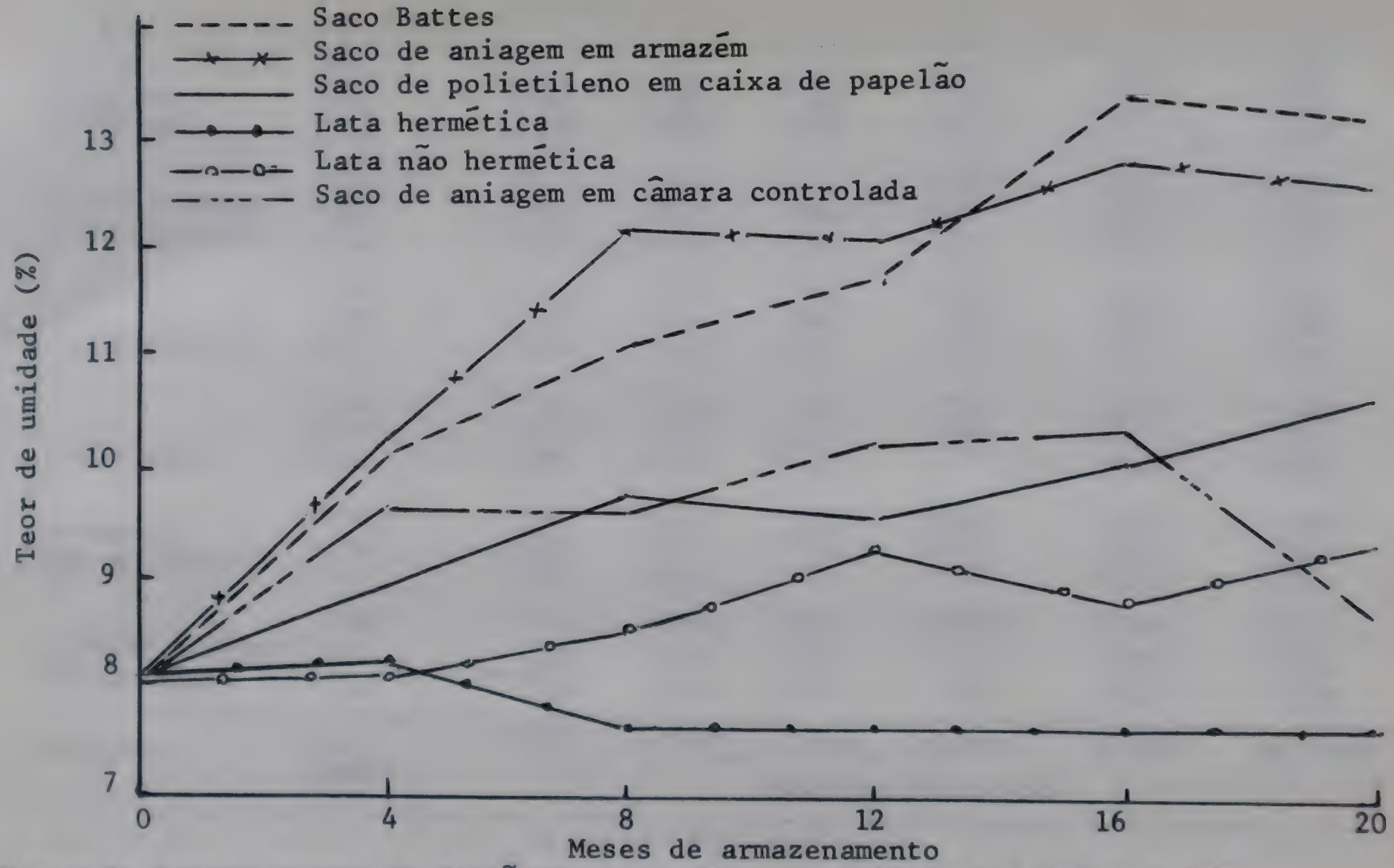


Figura 3. Armazenamento de feijão-de-mesa. Teor de umidade inicial = 8,08%

c) Feijão com 8,08% de umidade inicial(Figura 3). A melhor conservação de teor de umidade verificou-se no acondicionamento em lata hermética, seguindo-se daquele em lata não hermética. Nos demais casos, houve alterações mais acentuadas, que foram, pela ordem crescente, nos tratamentos sacos de polietileno acondicionados em caixa de papelão, sacos de aniagem em câmara controlada, sacos de papel multifoliados e sacos de aniagem em armazém.

2. Pesos e volumes específicos, aparentes e reais

No feijão com teor de 11,79% de umidade inicial, verificaram-se pequenas variações quanto aos pesos e volumes específicos aparentes e reais, praticamente, porém, pouco significativas. Apenas no final do armazenamento, verificou-se uma variação um pouco mais acentuada no pêso específico real, em todos os tratamentos, porém, sem ser significativa. As mesmas conclusões podem ser aplicadas para os feijões com 9,87 e 8,08% de umidade inicial.

3. Análise sensorial

No Quadro 4 estão indicados os resultados do julgamento das provas de avaliação dos tratamentos de feijão, pelo método sensorial "Triangular", segundo as comparações e os tempos de armazenamento estudados, assim como a significância estatística das diferenças encontradas.

Resultados (ver Quadro 4)

1a. Época (inicial): agôsto de 1968

A amostra de feijão com 11,79% de umidade diferiu, ao nível de 0,1%, da amostra com 9,87%, e também, ao nível de 1%, daquela com 8,08% de umidade. Não

houve diferença significativa entre as amostras de feijão com 9,87 e 8,08% de umidade. A mais preferida foi aquela com maior teor de umidade (11,79%) e, a menos preferida, aquela com menor teor e umidade (8,08%).

2a. Época: novembro de 1968

De tôdas as comparações feitas, as seguintes diferiram ao nível de 5%: 3x6; 3x12; 3x15; 10x13 e nível de 1%; 5x11; Na 1a. comparação, o tratamento 3 foi o mais preferido ao nível de 1%, na 2a. comparação, o tratamento 9 foi mais preferido ao nível de 5%; na 3a. não houve diferença de preferência; na 4a.o tratamento 13 foi mais preferido ao nível de 0,1%; na 5a. o tratamento 5 foi o mais preferido ao nível de 0,1%.

De modo geral, os tratamentos 4 e 7 alcançaram maior porcentagem e preferência e os tratamentos 10 e 11 a menor porcentagem de preferência.

3a. Época: abril de 1969

De tôdas as comparações feitas, apenas 1x7, 7 x 10 e 3 x 9 diferiram ao nível de 5%. Quanto à preferência, na 1a. comparação, a amostra 1 foi mais preferida ao nível de 1%; na 2a. comparação, a amostra 7 foi mais preferida; na 3a., a amostra 3 foi a mais preferida.

4a. Época: agôsto de 1969

Não foi efetuada.

5a. Época: novembro de 1969

Dentro da lata hermética, a amostra 1 diferiu das amostras 2 e 3, ao nível de 0,1% e 1% respectivamente. Quanto à preferência, a amostra 1 foi a mais preferida ao nível de 0,1%.

Dentro de saquinhos de polietileno, a amostra 8 diferiu, ao nível de 0,1%, da amostra 9. A amostra 7 não diferiu da amostra 8 e 9, mas foi mais preferida que estas ao nível de 1%.

Dentro de saco de aniagem em armazém e saco de aniagem em câmara controlada, não foram verificadas diferenças significativas.

Das comparações posteriores feitas entre os tratamentos 1, 5, 7, 10, 13 e 17, o tratamento 1 diferiu apenas do 17, sendo que êste foi o mais preferido ao nível de 1%; o tratamento 7 diferiu apenas do 10, sendo que êste foi o preferido ao nível de 5%; o tratamento 10 foi mais preferido, ao nível de 5%, do que o 7 e 13; e o tratamento 13 foi mais preferido que o 7, ao nível de 0,1%.

6a. Época: abril de 1970

Dentro de lata hermética não houve diferença significativa entre os diferentes teores de umidade.

Dentro de lata não hermética, o tratamento 5 diferiu, ao nível de 5%, do tratamento 6, sendo que êste foi mais preferido ao nível de 1%.

Dentro de saquinhos de polietileno, houve diferença significativa ao nível de 5%, entre os tratamentos 8 e 9, sendo que o último foi mais preferido ao nível de 0,1%.

Dentro de sacos multifoliados, dentro de sacos de aniagem em armazém e dentro de sacos de aniagem em câmara controlada, não houve diferença significativa.

Das comparações posteriores, feitas entre os tratamentos 3, 6, 7, 10, 13 e 19, o tratamento 3 dife-

riu, ao nível de 5%, apenas do 10, sendo o 3 mais preferido ao nível de 1%; o tratamento 6 diferiu apenas do 10, ao nível de 5%, sendo o 6 mais preferido ao nível de 0,1%; o tratamento 7 foi menos preferido que o 10, ao nível de 0,1%, foi mais preferido que o 13, ao nível de 1%, e menos preferido que o 18, ao nível de 0,1%, o tratamento 10 foi menos preferido que o 13 e 18, ao nível de 5%; e o tratamento 13 foi mais preferido que 18, ao nível de 1%.

Análise sensorial

De modo geral, os tratamentos com maior teor de umidade foram os mais preferidos. A partir dos 12 meses e até a época final, os testes triangulares passaram a ser feitos por eliminação, verificando-se que, para os casos com teor inicial de 11,79% de umidade, os tratamentos em sacos de papel multifoliados (5 fôlhas) Battes foram mais preferidos que os em saquinhos de polietileno (005); sacos de aniagem em armazém foram mais preferidos que sacos de aniagem em câmara controlada, com temperatura de 15-16°C e cêrca de 45% de umidade relativa.

A partir dos 12 até os 20 meses, os teores de umidade determinados a cada 4 meses, para o caso de sacos multifoliados, com teor inicial 1,79%, foram, respectivamente, de 12,05, 12,94 e 13,06%, com média de 12,68%; no tratamento em saquinhos de polietileno, as umidades em cada época foram de 12,34, 12,20 e 12,32%, sendo a média de 12,29%. No caso de feijão em sacos de aniagem em armazém, cujo teor inicial era de 11,79%, as umidades parciais (cada 4 meses), foram de 12,34, 13,64 e 12,29%, com a média de 12,29%, enquanto que para o tratamento de feijão com umidade inicial de 11,79% em câmara controlada, as umidades nas épocas correspondentes foram de 10,50, 10,43 e 9,12%, com média de 10,02%.

A preferência pelos degustadores foi, portanto, para os casos com maior teor de umidade.

Não se pode, no entanto, excluir a possibilidade dos teores altos de umidade provocarem deterioração, de acôrdo com o tempo de armazenamento, e sendo o produto com menor umidade menos aceito na degustação, conclui-se que o teor mais viável seria aquêle da ordem de 11,00%.

Quanto ao sabor, textura, côr e tempo de cozimento, estão em prosseguimento os estudos a respeito.

4. Análises químicas

Nos Quadros 5 a 13, estão indicados os resultados médios das análises químicas dos grãos e óleo de feijão, com umidade de 8,08, 9,87 e 11,79%, segundo os tipos de embalagem e as épocas de execução das determinações quadrimestrais, durante os 20 meses de armazenamento.

Proteína

Os resultados médios, em porcentagem, sôbre a matéria sêca, indicados no Quadro 6, mostram que para todos os tratamentos (tipos de embalagem) e tôdas as épocas das determinações, não houve alterações importantes. Algumas pequenas variações constatadas, são devidas a erros sistemáticos na execução das determinações.

Matéria não nitrogenada

Os resultados indicados no Quadro 7, mostram que não houve alteração em todos os tratamentos, durante o período estudado.

Fibra, cinza e cálcio

Da mesma forma, os resultados constantes dos Quadros 8, 9 e 10, revelam não ter havido variação nessas determinações, durante o armazenamento, em todos os tratamentos estudados.

Quadro 4. Resultados do julgamento das amostras de feijão, pelo método sensorial "Triangular", segundo as comparações de tratamentos e as épocas (tempos) de armazenamento.

1a. época (inicial) agosto 1968			2a. época nov.1968			3a. época abril 1969			5a. época nov.1969			6a. época abril 1970		
Comparações	J. T.	J.C.	Comparações	J.T.	J.C.	Comparações	J.T.	J.C.	Comparações	J.T.	J.C.	Comparações	J.T.	J.C.
1 x 2	38	24+++	1 x 4	14	8 n.s.	1 x 4	12	7 n.s.	1 x 2	16	12+++	1 x 2	18	9 n.s.
1 x 3	32	18++	1 x 7	10	6 n.s.	1 x 7	14	9+	1 x 3	12	9++	1 x 3	18	8 n.s.
2 x 3	38	17 n.s.	1 x 16	14	7 n.s.	1 x 16	16	8 n.s.	1 x 5	14	8 n.s.	2 x 3	16	8 n.s.
			2 x 5	14	6 n.s.	2 x 5	16	6 n.s.	1 x 7	12	4 n.s.	3 x 6	12	3 n.s.
			2 x 17	16	16 n.s.	2 x 17	10	6 n.s.	1 x 10	10	5 n.s.	3 x 7	14	8 n.s.
			3 x 6	20	11+	3 x 6	12	7 n.s.	1 x 13	12	3 n.s.	3 x 10	16	10+
			3 x 9	16	5 n.s.	3 x 9	12	8+	1 x 17	14	10++	3 x 13	16	5 n.s.
			3 x 15	16	10+	3 x 15	14	5 n.s.	2 x 3	12	3 n.s.	3 x 18	16	5 n.s.
			4 x 13	12	6 n.s.	4 x 13	14	5 n.s.	4 x 5	14	3 n.s.	4 x 5	16	5 n.s.
			5 x 11	16	11++	5 x 11	14	5 n.s.	4 x 6	14	6 n.s.	4 x 6	18	5 n.s.
			6 x 12	18	7 n.s.	6 x 12	16	5 n.s.	5 x 6	14	5 n.s.	5 x 6	16	10+
			7 x 10	18	8 n.s.	7 x 10	16	8 n.s.	5 x 7	16	5 n.s.	6 x 7	18	4 n.s.
			7 x 16	14	7 n.s.	7 x 16	16	8 n.s.	5 x 10	16	3 n.s.	6 x 10	16	10+
			8 x 11	14	6 n.s.	8 x 11	14	6 n.s.	5 x 13	14	3 n.s.	6 x 13	16	6 n.s.
			8 x 14	16	5 n.s.	8 x 14	14	3 n.s.	5 x 17	14	4 n.s.	6 x 18	18	9 n.s.
			9 x 12	14	9+	9 x 12	16	8 n.s.	7 x 8	10	3 n.s.	7 x 8	16	7 n.s.
			9 x 18	18	5 n.s.	9 x 18	14	3 n.s.	7 x 9	12	7 n.s.	7 x 9	16	6 n.s.
			10 x 13	18	10+	10 x 13	14	5 n.s.	7 x 10	14	9+	7 x 10	16	9 n.s.
			13 x 16	12	6 n.s.	13 x 16	15	10+	7 x 13	12	5 n.s.	7 x 13	16	8 n.s.
			14 x 17	18	7 n.s.	14 x 17	16	7 n.s.	7 x 17	14	5 n.s.	7 x 18	14	7 n.s.
			15 x 18	14	6 n.s.	15 x 18	14	5 n.s.	8 x 9	12	10+++	8 x 9	18	10+
									10 x 11	16	6 n.s.	10 x 11	18	8 n.s.
									10 x 12	8	2 n.s.	10 x 12	16	7 n.s.
									10 x 13	12	6 n.s.	10 x 13	16	5 n.s.
									10 x 17	14	7 n.s.	10 x 18	14	7 n.s.
									11 x 12	12	5 n.s.	11 x 12	18	6 n.s.
									13 x 14	14	7 n.s.	13 x 14	14	4 n.s.
									13 x 15	10	3 n.s.	13 x 15	16	3 n.s.
									13 x 17	16	4 n.s.	13 x 18	14	8 n.s.
									14 x 15	16	5 n.s.	14 x 15	16	7 n.s.
									16 x 17	14	6 n.s.	16 x 17	18	7 n.s.
									16 x 18	16	4 n.s.	16 x 18	18	7 n.s.
									17 x 18	12	3 n.s.	17 x 18	16	8 n.s.

\+ = p = 0,05
++ = p = 0,01
+++ = p = 0,001
n.s. = Não significativo
J.T. = Julgamentos totais
J.C. = Julgamentos corretos

Nota: A 4a. época não foi realizada.

Quadro 5. Avaliação da preferência comparada entre tratamentos de feijão, em porcentagem.

Tratamentos	Inicial	Épocas			
		2a.	3a.	5a.	6a.
	%	%	%	%	%
1	57,1	15,7	50,0	66,6	52,9
2	48,8	18,1	25,0	13,3	35,2
3	42,8	46,1	80,0	25,0	56,2
4		85,7	59,3	33,3	40,0
5		76,4	45,4	51,6	40,0
6		38,8	16,6	54,5	74,4
7		66,6	72,0	47,3	42,8
8		40,0	44,4	46,1	23,5
9		63,1	26,3	47,1	62,5
10		16,6	15,3	55,2	49,1
11		37,5	72,7	45,4	57,1
12		56,2	84,6	42,8	15,3
13		63,6	55,0	54,8	48,7
14		66,6	40,0	33,3	54,5
15		53,3	50,0	62,5	30,0
16		62,5	38,5	50,0	50,0
17		50,0	69,2	59,5	26,6
18		40,0	25,0	20,0	60,7

Quadro 6. Resultados médios das determinações de proteína dos feijões, em % sôbre a matéria sêca.

Embalagem	Umidade	Épocas das determinações					
		Início	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses
S.A.C.C.	8,08	26,85	27,71	28,63	27,82	25,12	27,23
S.A.A.	8,08	26,85	28,24	27,54	28,38	26,63	27,53
L.H.	8,08	26,85	27,05	28,73	28,61	26,94	27,64
L.N.H.	8,08	26,85	27,59	28,15	27,54	25,14	27,05
C.S.P.	8,08	26,85	26,96	28,20	28,32	26,54	27,37
S.B.	8,08	26,85	27,63	28,41	28,40	26,30	27,52
S.A.C.C.	9,87	27,44	27,10	28,11	28,66	26,59	27,59
S.A.A.	9,87	27,44	27,73	28,73	28,27	25,54	27,55
L.H.	9,87	27,44	28,04	28,87	28,26	25,90	27,61
L.N.H.	9,87	27,44	27,86	27,72	27,77	25,51	27,26
C.S.P.	9,87	27,44	27,22	28,74	29,00	26,31	27,75
S.B.	9,87	27,44	27,30	28,51	28,58	26,43	27,66
S.A.C.C.	11,79	27,02	27,08	27,29	27,99	24,58	26,79
S.A.A.	11,79	27,02	27,04	28,25	27,92	25,35	27,12
L.H.	11,79	27,02	27,13	28,61	-	25,94	27,31
L.N.H.	11,79	27,02	28,17	28,96	28,87	26,08	27,82
C.S.P.	11,79	27,02	28,14	28,00	27,37	26,15	27,34
S.B.	11,79	27,02	26,42	27,70	28,00	25,92	27,01

Quadro 7. Resultados médios das determinações de matéria não nitrogenada do feijão, em % sôbre a matéria sêca.

Embalagem	Umidade	Época das determinações					
		Início	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses
S.A.C.C.	8,08	59,10	62,08	60,14	61,31	64,12	61,35
S.A.A.	8,08	59,10	61,15	61,00	61,21	61,90	69,87
L.H.	8,08	59,10	62,58	61,53	61,01	61,48	61,14
L.N.H.	8,08	59,10	62,52	61,40	62,02	64,63	61,93
C.S.P.	8,08	59,10	62,42	61,00	60,39	62,64	61,11
S.B.	8,08	59,10	63,27	60,71	61,05	63,03	61,43
S.A.C.C.	9,87	58,64	62,90	60,49	61,21	62,34	61,12
S.A.A.	9,87	58,64	61,79	60,42	60,82	63,31	61,00
L.H.	9,87	58,64	61,19	60,83	61,18	62,51	60,87
L.N.H.	9,87	58,64	62,00	62,20	62,15	62,70	61,54
C.S.P.	9,87	58,64	62,81	60,81	60,32	63,42	61,20
S.B.	9,87	58,64	62,62	61,13	60,87	62,55	61,20
S.A.C.C.	11,79	60,38	62,75	61,78	61,54	63,35	61,96
S.A.A.	11,79	60,38	63,68	60,77	61,36	63,25	61,89
L.H.	11,79	60,38	62,24	60,71	-	62,00	61,30
L.N.H.	11,79	60,38	61,25	59,56	60,42	62,68	60,86
C.S.P.	11,79	60,38	61,33	61,20	61,69	62,59	61,44
S.B.	11,79	60,38	64,15	61,22	61,07	62,71	61,91

Quadro 8. Resultados médios das determinações de fibra dos feijões, em % sôbre a matéria sêca.

Embalagem	Umidade	Época das determinações					
		Início	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses
S.A.C.C.	8,08	9,27	5,66	5,95	5,79	5,66	5,05
S.A.A.	8,08	9,27	5,75	5,96	5,25	6,02	5,46
L.H.	8,08	9,27	5,79	4,54	5,17	5,43	5,09
L.N.H.	8,08	9,27	5,47	5,00	5,16	5,43	5,28
C.S.P.	8,08	9,27	6,03	5,57	5,47	5,42	6,14
S.B.	8,08	9,27	4,80	5,41	5,21	5,55	5,30
S.A.C.C.	9,87	9,22	5,44	5,94	5,01	5,73	5,33
S.A.A.	9,87	9,22	5,87	5,71	5,55	5,75	5,13
L.H.	9,87	9,22	5,90	4,85	5,41	5,68	5,98
L.N.H.	9,87	9,22	5,82	4,68	5,10	5,53	5,05
C.S.P.	9,87	9,22	5,51	5,22	5,45	5,61	6,86
S.B.	9,87	9,22	5,52	4,91	5,47	5,63	5,61
S.A.C.C.	11,79	8,41	5,60	5,50	5,42	5,38	4,62
S.A.A.	11,79	8,41	4,93	5,53	5,43	5,86	4,91
L.H.	11,79	8,41	5,95	5,26	-	5,67	5,28
L.N.H.	11,79	8,41	5,87	5,68	5,39	5,25	5,43
C.S.P.	11,79	8,41	5,89	5,32	5,61	5,56	5,18
S.B.	11,79	8,41	5,09	5,74	5,80	5,44	5,29

Quadro 9. Resultados médios das determinações de cinzas dos feijões, em % sôbre a matéria sêca.

Embalagem	Umidade	Época das determinações					
		Início	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses
S.A.C.C.	8,08	4,29	4,05	3,47	3,41	3,95	3,84
S.A.A.	8,08	4,29	4,20	3,65	3,56	3,79	3,66
L.H.	8,08	4,29	3,97	3,53	3,49	3,97	3,83
L.N.H.	8,08	4,29	3,87	3,84	3,58	4,18	3,93
C.S.P.	8,08	4,29	3,90	3,66	3,61	3,79	3,90
S.B.	8,08	4,29	3,74	3,64	3,48	3.73	3,71
S.A.C.C.	8,08	4,29	3,98	3,71	3,52	3,70	3,68
S.A.A.	8,08	4,29	4,02	3,42	3,64	3,78	3,57
L.H.	8,08	4,29	4,30	3,64	3,51	3,69	3,83
L.N.H.	8,08	4,29	3,80	4,64	3,42	4,38	3,92
C.S.P.	8,08	4,29	3,76	3,63	3,56	3,79	3,79
S.B.	8,08	4,29	4,00	3,63	3,48	3,91	3,41
S.A.C.C.	11,79	3,83	4,02	3,76	3,30	4,02	4,00
S.A.A.	11,79	3,83	3,77	3,68	3,67	3,89	4,76
L.H.	11,79	3,83	4,10	3,67	-	4,18	3,88
L.N.H.	11,79	3,83	4,11	4,11	3,65	3,92	4,24
C.S.P.	11,79	3,83	4,10	3,68	3,52	4,07	3,76
S.B.	11,79	3,83	3,73	3,65	3,49	3,85	3,43

Quadro 10. Resultados médios das determinações de cálcio dos feijões em mg/100g sôbre a matéria sêca.

Embalagem	Umidade inicial	Época das determinações					
		Início	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses
S.A.C.C.	8,08	117	115	118	123	104	115
S.A.A.	8,08	117	121	130	123	109	120
L.H.	8,08	117	115	130	108	106	115
L.N.H.	8,08	117	105	103	114	97	107
C.S.P.	8,08	117	114	132	111	100	115
S.B.	8,08	117	102	90	113	103	105
S.A.C.C.	9,87	133	123	130	129	109	125
S.A.A.	9,87	133	121	127	127	110	124
L.H.	9,87	133	116	123	113	111	119
L.N.H.	9,87	133	118	135	104	115	121
C.S.P.	9,87	133	122	144	122	99	124
S,B,	9,87	133	116	137	105	105	119
S.A.C.C.	11,79	123	115	128	110	108	117
S.A.A,	11,79	123	110	108	121	101	113
L.H.	11,79	123	126	128	-	123	125
L.N.H.	11,79	123	126	142	127	110	126
C.S.P.	11,79	123	115	125	112	109	117
S.B.	11,79	123	114	109	120	114	116

Quadro 11. Resultados médios das determinações de ferro dos feijões, em mg/100 g sôbre a matéria sêca.

Embalagem	Umidade	Época das determinações					
		Início	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses
S.A.C.C.	8,o8	5,4	6,8	10,5	6,1	9,0	7,1
S.A.A.	8,08	5,4	2,0	10,9	11,2	11,0	2,6
L.H.	8,08	5,4	6,2	9,6	4,1	4,0	6,0
L.N.H.	8,08	5,4	4,7	11,5	2,2	14,0	4,4
C.S.P.	8,08	5,4	9,2	8,5	6,7	9,0	4,9
S.B.	8,08	5,4	3,7	9,4	7,2	4,5	4,8
S.A.C.C.	9,87	6,1	8,0	9,8	3,0	7,0	7,9
S.A.A.	9,87	6,1	7,1	10,8	11,2	3,9	4,2
L.H.	9,87	6,1	11,9	11,1	4,5	3,1	4,3
L.N.H.	9,87	6,1	2,3	9,2	8,9	17,7	6,0
C.S.P.	9,87	6,1	1,4	9,0	3,5	4,6	6,8
S.B.	9,87	6,1	6,2	9,0	5,6	4,4	2,8
S.A.C.C.	11,79	6,9	5,7	9,9	8,8	7,4	6,0
S.A.A.	11,79	6,9	7,8	13,3	14,8	4,0	3,4
L.H.	11,79	6,9	3,4	9,9	-	8,4	4,2
L.N.H.	11,79	6,9	5,8	13,6	10,7	3,9	11,0
C.S.P.	11,79	6,9	16,5	10,0	5,1	7,2	6,2
S.B.	11,79	6,9	2,1	9,5	6,2	7,2	4,5

Quadro 12. Resultados médios das determinações de fosfato dos feijões, em mg/100g sôbre a matéria sêca.

Embalagem	Umidade	Épocas das determinações					
		Início	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses
S.A.C.C.	8,08	1.138	1.052	1.201	997	1.153	1.052
S.A.A.	8,08	1.138	1.121	1.151	1.138	1.084	1.066
L.H.	8,08	1.138	1.093	1.202	916	1.165	1.203
L.N.H.	8,08	1.138	1.096	1.183	1.155	1.109	1.164
C.S.P.	8,08	1.138	1.109	1.245	1.143	1.081	1.183
S.B.	8,08	1.138	1.113	1.073	1.050	1.087	1.108
S.A.C.C.	9,87	1. 105	1.079	1.172	1.031	1.125	1.092
S.A.A.	9,87	1.105	1.062	1.094	1.118	1.009	1.107
L.H.	9,87	1.105	727	1.182	1.212	1.139	1.181
L.N.H.	9,87	1.105	1.136	1.156	1.308	1.096	1.155
C.S.P.	9,87	1.105	1.082	1.161	1.218	1.121	1.215
S.B.	9,87	1.105	1.105	1.212	1.057	1.124	1.089
S.A.C.C.	11,79	1.304	1.029	1.152	833	1.254	1.181
S.A.A.	11,79	1.304	1.139	1.188	1.197	1.064	1.185
L.H.	11,79	1.304	1.082	1.223	-	1.116	1.206
L.N.H.	11,79	1.304	1.079	1.127	1.110	1.023	1.155
C.S.P.	11,79	1.304	1.054	1.225	1.234	1.119	1.255
S.B.	11,79	1.304	1.155	1.211	1.200	1.153	1.216

Quadro 13. Resultados médios das determinações de acidez do óleo dos feijões, em %.

Embalagem	Umidade	Época das determinações					
		Início	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses
S.A.C.C.	8,08	1,56	-	1,60	2,11	2,56	4,44
S.A.A.	8,08	1,56	-	2,67	3,10	3,99	4,73
L.H.	8,08	1,56	-	0,53	1,97	1,42	2,01
L.N.H.	8,08	1,56	-	0,80	2,54	1,71	3,44
C.S.P.	8,08	1,56	-	1,60	2,54	2,28	3,02
S.B.	8,08	1,56	-	2,14	3,38	3,99	3,87
S.A.C.C.	9,87	1,34	-	1,60	2,25	2,28	3,58
S.A.A.	9,87	1,34	-	2,67	3,67	3,42	2,43
L.H.	9,87	1,34	-	1,87	1,70	3,00	3,58
L.N.H.	9,87	1,34	-	2,14	2,54	3,28	3,30
C.S.P.	9,87	1,34	-	1,87	2,82	3,85	3,02
S.B.	9,87	1,34	-	2,14	3,38	3,70	4,15
S.A.C.C.	11,79	1,55	-	1,60	0,28	2,20	2,01
S.A.A.	11,79	1,55	-	2,14	4,00	2,80	4,59
L.H.	11,79	1,55	-	2,67	-	3,40	3,73
L.N.H.	11,79	1,55	-	2,67	1,90	3,90	5,45
C.S.P.	11,79	1,55	-	2,40	3,38	3,90	4,73
S.B.	11,79	1,55	-	2,67	2,00	3,90	4,59

Quadro 14. Resultados médios das determinações do índice de peróxido no óleo dos feijoes, em m.eq./kg.

Embalagem	Umidade	Épocas das determinações					
		Início	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses
S.A.C.C.	8,08	0,20	-	0,31	0,40	2,25	3,50
S.A.A.	8,08	0,20	-	0,40	0,60	2,02	3,00
L.H.	8,08	0,20	-	0,21	0,80	3,37	2,50
L.N.H.	8,08	0,20	-	0,30	0,40	0,00	3,00
C.S.P.	8,08	0,20	-	0,10	0,40	1,80	3,50
S.B.	8,08	0,20	-	0,10	0,40	3,15	2,50
S.A.C.C.	9,87	0,70	-	0,15	0,40	0,40	10,50
S.A.A.	9,87	0,70	-	0,20	0,40	2,70	3,00
L.H.	9,87	0,70	-	0,25	0,80	0,67	3,00
L.N.H.	9,87	0,70	-	0,00	0,50	0,00	1,00
C.S.P.	9,87	0,70	-	0,37	0,80	0,67	0,50
S.B.	9,87	0,70	-	0,34	0,00	0,20	1,50
S.A.C.C.	11,79	0,20	-	0,00	0,60	1,20	9,00
S.A.A.	11,79	0,20	-	0,00	0,20	0,60	6,50
L.H.	11,79	0,20	-	0,20	-	1,60	2,50
L.N.H.	11,79	0,20	-	0,00	0,80	0,60	3,50
C.S.P.	11,79	0,20	-	0,37	0,40	0,60	0,50
S.B.	11,79	0,20	-	0,35	0,00	0,60	1,50

Ferro e fosfato

Os resultados, em mg/100 g, indicados nos Quadros 11 e 12, revelam não ter havido, igualmente, variações importantes. Algumas variações nas determinações de Fe^{++}, em um caso ou outro, devem ser atribuídas a impurezas eventualmente contidas nas amostras.

Acidez do óleo

Os resultados das determinações de ácido graxo livre da matéria graxa, em porcentagem, constantes do Quadro 13, mostram que houve um aumento gradativo com o tempo de armazenamento, para todos os tratamentos correspondentes aos três lotes de feijão com diferentes graus de hidrólise da matéria graxa. Até a terceira época (após 8 meses de armazenamento), o lote com 8,08% de umidade inicial foi o que apresentou menor aumento da acidez de óleo, ao contrário do lote de feijão com 11,79% de umidade inicial, que apresentou maior aumento. Aos 12 e 16 meses de armazenamento, não se observou, pràticamente, diferença entre os três lotes de feijão, porém, aos 20 meses, os resultados correspondentes ao lote de feijão com 11,79% de umidade inicial foram ligeiramente mais altos, de modo geral.

Considerando-se os resultados segundo os teores iniciais de umidade, verifica-se que no feijão com 8,08% de umidade inicial, no tratamento da lata hermética o óleo apresentou menor porcentagem de ácido graxo livre, ao passo que nos tratamentos de sacos de papel multifoliados e sacos de aniagem, em armazém, os valores determinados foram mais elevados. No lote com 9,8% de umidade houve pequenas diferenças entre os diferentes tratamentos, mas o tratamento do saco de aniagem em câmara controlada, apresentou porcentagem de ácido graxo livre ligeiramente mais baixa, enquanto que os tratamentos de sacos de aniagem em armazém é de sacos de papel multifoliados, valores ligeiramente mais altos. No lote com 11,79% de umidade, não houve, pràticamente, diferenças entre os tratamentos, com ex-

ceção do saco de aniagem em câmara controlada, que apresentou acidez significativamente menor.

Índice de peróxido

Os resultados constantes do Quadro 14 mostram que o índice de peróxido do óleo se eleva ligeiramente com o decorrer do armazenamento, não havendo, pràticamente, diferença entre os lotes com os três diferentes graus de umidades iniciais. Dentro de cada lote de grau de umidade, verifica-se que naquele com 8,08% de umidade inicial, o tratamento de lata não hermética apresentou valores ligeiramente mais baixos que os dos outros tratamentos. No lote com 9,87% de umidade, os tratamentos de lata não hermética, sacos de polietileno em caixa de papelão e sacos de papel multifoliado , deram valores ligeiramente mais baixos, enquanto que o tratamento de sacos de aniagem em câmara controlada, valores ligeiramente mais altos. No lote com 11,79% de umidade, os tratamentos de sacos de polietileno em caixa de papelão e sacos de papel multifoliado, deram valores ligeiramente mais baixos, enquanto que o tratamento de sacos de aniagem em câmara controlada, valores ligeiramente mais altos. No lote com 11,79% de umidade, os tratamentos de sacos de polietileno em caixa de papelão e sacos de papel multifoliados, deram, igualmente, valores mais baixos, ao passo que o tratamento de sacos de aniagem em câmara controlada, valores ligeiramente mais altos.

5. Germinação

Os resultados dos testes de germinação efetuados com amostras de feijão de cada tratamento, no início do ensaio e a cada quadrimestre, inclusos no Quadro 15, revelam que durante os 20 meses de armazenamento não houve, pràticamente, qualquer modificação significativa no poder germinativo dos feijões.

6. Infestação de insetos

Os exames procedidos em amostras de sementes correspondentes a todos os tratamentos estudados,

durante o transcurso do armazenamento, cujos resultados estão inseridos no Quadro 16, mostram que não houve ocorrência de insetos prejudiciais ao feijão. As porcentagens de grãos danificados encontrados nos exames, não são pràticamente desprezíveis, eram conseqüentes a grãos já danificados, antes de serem armazenados.

CONCLUSÕES

Nas condições de estocagem de feijão em armazéns comuns, o emprêgo de latas herméticas ou não herméticas é o que oferece melhores resultados quanto à conservação do teor de umidade do produto.

Para os três teores de umidade inicial estudados, compreendidos entre 8 e 12%, pràticamente não se observaram, em todos os tipos de acondicionamento empregados, alterações que afetassem significativamente os pesos e os volumes específicos do feijão.

De modo geral, nas provas de degustação realizadas, verificou-se que havia, dentro da faixa de 8-12% de umidade inicial, maior preferência para o feijão dos tratamentos com maior teor de umidade. Contudo, em relação ao sabor, à textura, à côr e ao tempo de cocção, os estudos devem ser prosseguidos, a fim de ser encontrado o teor de umidade ideal.

As análises químicas procedidas em feijões de todos os tratamentos, durante o transcurso do armazenamento, mostraram que não houve modificações significativas na composição do feijão em relação aos constituintes proteína, matéria não nitrogenada, fibra, cinza, cálcio, ferro e fosfato.

As análises químicas do óleo revelaram haver um aumento gradativo na porcentagem de ácidos graxos livres no feijão de todos os acondicionamentos estudados, indicando, assim, uma ligeira hidrólise da ma

Quadro 15. Resultados médios dos testes de germinação dos feijões, em % de germinação.

Embalagem	Umidade	Épocas de germinação					
		Início	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses
S.A.A.C.	8,08	96	96	97	94	96	98
S.A.A.	8,08	96	98	98	92	96	95
L.H.	8,08	96	98	98	92	97	96
L.N.H.	8,08	96	98	97	94	98	97
C.S.P.	8,08	96	98	98	90	97	96
S.B.	8,08	96	99	95	93	96	96
S.A.C.C.	9,87	96	98	99	90	96	97
S.A.A.	9,87	96	98	98	90	91	92
L.H.	9,87	96	98	99	95	98	96
L.N.H.	9,87	96	99	98	94	94	96
C.S.P.	9,87	96	97	99	93	96	94
S.B.	9,87	96	96	99	91	95	92
S.A.C.C.	11,79	97	96	98	92	97	97
S.A.A.	11,79	97	98	97	94	91	90
L.H.	11,79	97	99	98	-	88	96
L.N.H.	11,79	97	97	98	95	96	98
C.S.P.	11,79	97	98	99	93	96	95
S.B.	11,79	97	99	96	94	94	94

Quadro 16. Resultados dos exames de infestação de insetos em feijões, em porcentagem de grãos atacados durante o tempo de armazenamento.

Tratamentos Material limpo, expurgado e ventilado			ÉPOCAS									
		Início	4 meses		8 meses		12 meses		16 meses		20 meses	
Embalagem	Umidade inicial		G.A.	I.E.	G.A.	I.E.	G.A.	I.E.	G.A.	I.E.	G.A.	I.E.
S.A.C.C.	8,08	Isento de infestação	0,59	0	0,10	0	0,10	0	0,44	0	0,63	0
S.A.A.	8,08		0,44	0	0,21	0	0,20	0	0,00	0	0,00	0
L.H.	8,08		1,12	0	0,28	0	0,19	0	0,42	0	0,25	0
L.N.H.	8,08		0,56	0	0,17	0	0,00	0	0,63	0	0,13	0
C.S.P.	8,08		0,76	0	0,00	0	0,29	0	0,00	0	0,13	0
S.B.	8,08		0,45	0	0,10	0	0,10	0	0,00	0	0,25	0
S.A.C.C.	9,87		0,47	0	0,19	0	0,10	0	0,00	0	0,13	0
S.A.A.	9,87		0,58	0	0,10	0	0,20	0	0,67	0	0,00	0
L.H.	9,87		0,45	0	0,20	0	0,10	0	0,22	0	0,13	0
L.N.H.	9,87		0,58	0	0,20	0	0,29	0	0,22	0	0,25	0
C.S.P.	9,87		0,70	0	0,39	0	0,21	0	0,23	0	0,13	0
S.B.	9,87		0,57	0	0,00	0	0,10	0	0,45	0	0,13	0
S.A.C.C.	11,79		0,34	0	0,41	0	0,10	0	0,67	0	0,38	0
S.A.A.	11,79		0,79	0	0,20	0	0,20	0	0,44	0	1,11	0
L.H.	11,79		0,58	0	0,00	0	-	-	0,45	0	0,13	0
L.N.H.	11,79		0,77	0	0,30	0	0,10	0	0,00	0	0,00	0
C.S.P.	11,79		0,88	0	0,39	0	0,21	0	0,00	0	0,13	0
S.B.	11,79		1,39	0	0,10	0	0,21	0	0,45	0	0,25	0

G.A. = *Grãos atacados.*
I.E. = *Insetos encontrados.*

téria-graxa. A elevação de ácidos graxos livres foi ligeiramente maior nos tratamentos com maior teor de umidade, porém, sem que êsse fato afetasse a qualidade do produto.

O índice de peróxido aumentou com o tempo de armazenamento, não havendo, porém, diferenças entre os feijões com diferentes teores de umidade inicial.

As determinações do poder germinativo das sementes, durante os 20 meses de estudo, mostraram haver satisfatória porcentagem de germinação. Não se verificaram, dentro da faixa de 8-12% de umidade inicial dos feijões, diferenças significativas nas porcentagens de germinação.

Finalmente, o produto ventilado, expurgado e armazenado durante 20 meses, não apresentou indícios de ocorrência de insetos específicos prejudiciais.

LITERATURA

1. HERMAN, J. M. & WOOD, E. R. Influence of moisture content on keeping quality of dry beans. Food Technology 10 (5): 225-229, 1956.

2. KAN, S. Pectie substances of dry beans and their possible correlation with cooking time. Jour. Food Sci. 33: 437-438, 1968.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/1970

ARMAZENAMENTO DE CAFÉ BENEFICIADO A GRANEL, EM SILO COM VENTILAÇÃO NATURAL

Braz Antonio Jordão
Ruth S. Garrutti
Eidiomar Angelucci
João S. Tango
Yara Tosello

RESUMO

A experiência demonstra perfeita viabilidade da guarda de café beneficiado, por longo tempo em silo de célula metálica, não hermética, com ventilação natural, sem a prática de transilagens periódicas, desde que sejam tomadas as necessárias precauções contra a infiltração de umidade.

O grão de café beneficiado e armazenado nas citadas condições, por longo tempo, é, no entanto, alterado em algumas de suas características, como o conteúdo de umidade, o pêso específico, a côr, o tipo e a peneira, com variações que se manifestam mais pronunciadamente no produto localizado na camada superior da célula.

A experiência demonstra, ainda, no caso de armazenamento sem transilagens periódicas, que o citado sistema pode oferecer melhor resultado na preservação daquelas características e na aparência geral, do que quando em guarda em célula metálica, não hermética, sem ventilação natural. O resultado é notadamente melhor, quando comparado com o do sistema de armazenamento em sacas empilhadas em armazéns.

Quanto ao gôsto da bebida, não foram verificadas alterações consideradas significativas em quaisquer dos sistemas de armazenamento referidos.

Com o tempo de armazenamento observa-se aumento gradual das porcentagens de ácidos graxos livres, sendo mais altos os valores no café localizado na camada superior da célula.

A acidez do grão de café sofre variações, tanto na camada superior como inferior, verificando-se, contudo, de modo mais acentuado na parte inferior. No entanto, no silo ventilado naturalmente, essas variações mostraram-se de modo menos pronunciado do que em comparação com o café armazenado em silo sem ventilação, ou em sacas em armazém.

Os componentes analisados, como o nitrogênio, os açúcares totais e a cafeína, apresentaram variações porém não mostraram diferenças notáveis. Portanto, não houve influência do sistema de armazenamento.

SUMMARY

SILO STORAGE OF TREATED GREEN COFFEE IN CONDITIONS OF NATURAL VENTILATION. *The possibility of storing treated green coffee for a three year period in barns was investigated. The results showed that alghough were observed, the organoleptic characteristics did not change.*

These conclusions are valid for good quality green coffee, with a humidity of 10-11%, stored in a metal barn, with natural ventilation passing from the bottom to the top.

Even though the coffee was not transferred, as it is commonly be better than "in-bag" storage in a warehouse, or storage in a common silo or elevator type silo.

INTRODUÇÃO

Como maior produtor mundial de café, situando-se, ainda, entre os grandes exportadores, o Brasil necessita solucionar, urgentemente, não só problema de estocagem do produto por intermédio de grandes rêdes de armazéns e silos, como também o do seu armazenamento nas propriedades rurais, utilizando-se de silos constituídos de células de média ou pequena capacidade.

Sendo a estocagem do café nas entressafras feita em sacas empilhadas em armazéns, a constatação da viabilidade da guarda do produto a granel passa a ser de grande importância.

Em experiências anteriores realizadas pelos autores, havia sido demonstrado a perfeita viabilidade e vantagens do armazenamento do café beneficiado a granel em silos-elevadores, isentos de ventilação natural, metálicos ou de concreto, providos de completo equipamento para manuseio. Há, porém, que se constatar, também, a viabilidade de armazenamento em silos rurais, em que a utilização de completos equipamentos para o manuseio, a prática das transilagens e outros processos para a conservação dos grãos por longos períodos de tempo, está fora do alcance dos fazendeiros. As transilagens, embora benéficas, de fácil execução em silos providos de equipamentos apropriados, não deixam de encarecer de certo modo o produto pela exigência do consumo de energia e de tempo dispendido. Êsse fato torna-se ainda mais ponderável, tratando-se de silos para uso em fazendas.

Embora o armazenamento pelo sistema tradicional de sacas possa oferecer algumas vantagens, o processo a granel é muito mais vantajoso, proporcionando ao produto melhores condições de conservação, de higiene, além de evitar a necessidade de excesso de mão-de-obra no manuseio, que é por demais oneroso, e atualmente, bastante escassa.

Com o objetivo de verificar a viabilidade e eficiência da conservação do café beneficiado por estocagem a granel durante longo tempo, substituindo-se as transilagens periódicas dos grãos pela ventilação natural, os autores executaram experiências de armazenamento com um tipo de silo metálico, de parede tripla, tido como de aquisição ao alcance dos pequenos e médios cafeicultores.

MATERIAL E MÉTODOS

Para os estudos aqui relatados, utilizou-se como matéria-prima café beneficiado, processado por via sêca, de peneiras 14, 15 e 16, fornecido pelo IBC.

Dividiu-se a amostra de café em três lotes, dos quais um foi guardado em sacos de aniagem em armazém, e os outros dois em silos metálicos, com e sem ventilação natural, respectivamente.

O lote em armazém foi constituído de pilhas básicas de 6 sacas de lastro e 20 de altura, assentadas sôbre piso especial de asfalto coberto por sacos vazios de aniagem. Cada quatro pilhas justapostas formava um bloco de 480 sacas, sendo de três o número total de blocos.

O silo-elevador metálico, sem ventilação natural, foi totalmente carregado com cêrca de 13,2 toneladas de café beneficiado, enquanto que aquele com ventilação natural, da marca Du Vent, de fabricação da Metalmecânica, foi carregado com cêrca de 42 toneladas do produto, deixando-se pequeno espeço vazio na parte superior da célula.

Tanto o armazém, como o silo-elevador sem ventilação natural, foram construídos segundo as recomendações das normas técnicas da Comissão Consultiva de Armazéns e Silos, do Ministério da Agricultura, 1937.

O café do silo-elevador não foi submetido a transilagens periódicas durante mais de 3 anos. No caso do silo ventilado, também não foram efetuadas transilagens até o final do ensaio, que teve a duração de aproximadamente 4,5 anos.

Foram procedidas coletas periódicas de amostras de café para estudos, a cada 4 meses, aproximadamente, durante o período de comparação.

No armazém, as coletas foram executadas lateralmente aos blocos, nas três camadas superiores e inferiores, respectivamente. Nos silos, as tomadas de amostras foram feitas nas camadas superiores e inferiores de café.

Um termo-higrógrafo colocado no armazém, com troca semanal de mapas, permitiu a obtenção de dados médios de temperatura e umidade relativa ao abrigo, durante o período de 3,5 anos do ensaio.

Nos silos, a determinação de temperaturas da massa de café foi feita por meio de pares termoelétricos, diàriamente, pela manhã e à tarde. No silo-elevador, a cada metro de altura, em seis pontos diferentes do interior e um do exterior. No silo ventilado, na direção leste-oeste da célula, em dois pontos periféricos, na altura mediana, e em dois outros pontos, na parte central, próximos do fundo. Ao mesmo tempo, foram feitas anotações da temperatura ambiente. No Quadro 12, estão indicadas as médias de temperatura interna e externa da massa de café e do ar ambiente, de manhã e à tarde, em diferentes períodos.

Descrição sucinta do silo metálico de ventilação natural marca Du Vent (Figura 1).

O silo é metálico, de formato cilíndrico, de paredes triplas e com fundo e teto cônicos. As paredes interna e externa apresentam aberturas em fenda, do tipo veneziana, para permitir a circulação do ar em ambas as faces da parede central. A parede externa

evita a incidência direta dos raios solares sôbre a parede central, permitindo, ao mesmo tempo, a circulação e renovação do ar quente em contacto com a sua superfície externa.

O silo é ainda provido de um conduto central ou torre de ventilação, de secção quadrangular, e paredes com aberturas do tipo veneziana, ligada inferiormente á tubulação de tomada de ar exterior. Esta última é provida de um filtro para impedir a penetração de insetos, pó, etc., juntamente com o ar externo, que é levado à torre de ventilação e, através das aberturas desta, distribuído no interior da célula. O ar novo circula naturalmente em camadas horizontais, a diferentes alturas do interior da célula, atingindo a face interna da sua parede central. O ar escapa para o exterior através da chaminé da cabeça de ventilação, situada na parte superior da torre.

O silo é suscetível de ser fechado hermèticamente, devendo-se, nesse caso, fechar a cabeça de ventilação, bem como as tampas das janelas de inspecção, do orifício de descarga e do tubo de entrada de ar.

A carga e a descasga de produtos são feitas por cima e por baixo do silo, respectivamente, e por meio de rôsca carregadeira-descarregadeira movimentada a motor elétrico.

No teto cônico, seis tubos de cêrca de 3" de diâmetro, situados todos na mesma direção em relação à secção vertical, sendo três de um lado e três de outro lado, permitem proceder à coleta de amostras de produto ensilado, na parte superior do silo. A amostragem da camada inferior do produto é feita através da tampa de inspecção situada na base do silo.

Para tomadas de temperatura da massa de produto armazenado, foram instalados cabos para pares termoelétricos, de modo a permitir leituras de temperatura nas regiões central-inferior e mediana do silo, bem como do ambiente exterior.

Determinações físico-mecânicas

a) Umidade. As determinações dos teores de umidade das amostras de café foram feitas em estufa comum, automática, à temperatura de 100-105°C durante 24 horas, até pouco pêso constante.

b) Pêso específico aparente. Determinado por pesagem de amostras de volume constante. Por definição, é a relação entre pêso e volume constante do produto.

c) Pêso específico real. Determinado em proveta graduada, com água, mediante imersão de amostras de café de pêso constante. Por definição, é a relação entre pêso constante e volume real.

Classificação comercial

As determinações do tipo, peneira, côr e bebida das amostras de café, foram efetuadas pelo serviço de classificação do IBC, da agência de São Paulo.

Análises químicas

Nas amostras de café foram efetuadas as seguintes análises químicas:

1. No grão moído

a) Acidez. Determinada pelo método da AOAC, Association of Official Agricultural Chemists.

b) Nitrogênio. Determinado pelo método de Kjedahl.

c) Carboidratos. Determinado pelo método de Munson & Walker.

d) Cafeína. Determinada pelo método espectrofotometrico.

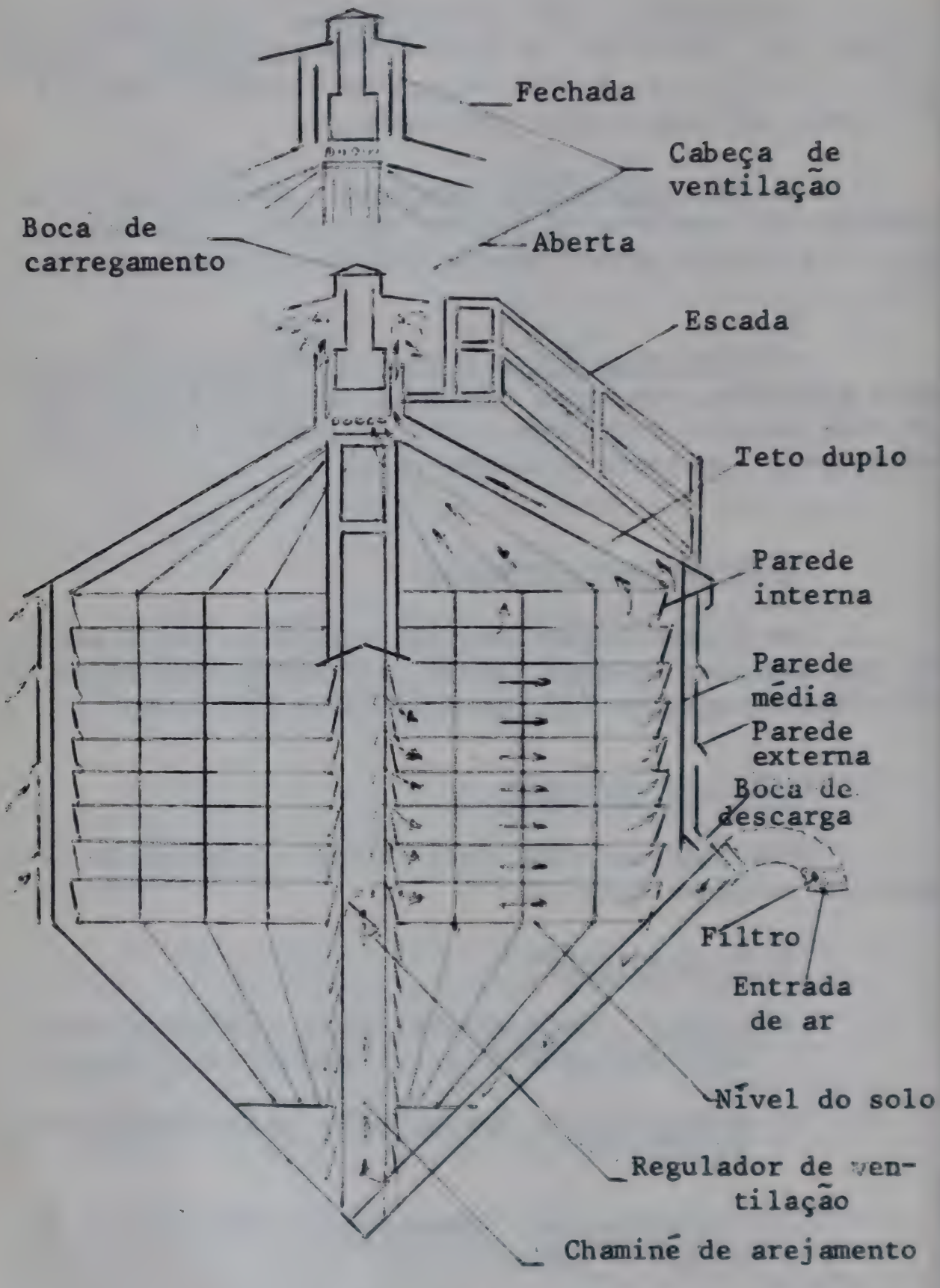

Fechada
Cabeça de ventilação
Boca de carregamento
Aberta
Escada
Teto duplo
Parede interna
Parede média
Parede externa
Boca de descarga
Filtro
Entrada de ar
Nível do solo
Regulador de ventilação
Chaminé de arejamento

Figura 1.

2. No óleo

a) Acidez. Determinada pelo método Ca-5a-40 da AOCS, American Oil Chemists Society.

b) Índice de peróxido. Determinado pelo método Cd 8-53 da AOCS.

Análise sensorial

Na análise sensorial para classificação da bebida, utilizou-se o delineamento estatístico de Quadrado Latino 4 x 4.

Infestação de insetos

Os exames das amostras de café, armazenadas em silo com ventilação natural, foram procedidas, inicialmente, pelo Instituto Biológico, e depois, pela Seção de Entomologia Aplicada do Instituto Agronômico de Campinas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características físico-mecânicas

Teor de umidade

No Quadro 1, estão reunidas as médias de teor de umidade nas amostras de café, segundo as datas das determinações e o tipo de armazenamento do produto, e no Quadro 2, segundo, ainda, a posição da camada de café armazenado.

Verifica-se, pelos dados contidos nesses Quadros, que o teor de umidade do café, nas condições ambientes de 65-75% de umidade relativa e 23-25°C de temperatura, sofreu variações durante o armazenamento

no silo ventilado, com tendência para diminuição, tanto da camada superior como inferior, porém de modo não significativo do ponto-de-vista prático. No período compreendido entre o 20º mês até cêrca de 4,5 anos de estocagem, verificou-se, embora com pequena redução, certa estabilidade da umidade na massa de café da camada inferior, sendo esta ligeiramente mais úmida que a do produto localizado na camada superior.

Quadro 1. Umidade média do café, em %, segundo os tipos de armazenamento e as datas de determinações.

Tipo de armazenamento	Inicial Maio 1966	Agosto 1966	Datas das determinações Dez. 1966	Abril 1967	Agosto 1967	Dez. 1967	Março 1968	Set. 1968	Mar. 1969	Mar. 1971
Silo ventilado	10,44	-	10,02	10,04	10,35	10,52	9,60	9,44	9,60	9,59 (*)
Armazém	11,14	11,18	11,22	12,48	10,87	12,36	11,10	10,60	11,33	-
Silo não ventilado (elevador)	10,09	10,58	10,70	11,12	10,96	11,02	10,57	10,28	10,51	-

(*)
Obs. - a) Média das camadas superior e inferior : 9,59%.

b) No final do ensaio - Camada mediana - determinação direta : 9,70%.

Quadro 2. Umidade do café, em %, segundo o tipo de armazenamento, a posição da camada e as datas das determinações.

Tipo de armazenamento e posição da camada do café		Datas das determinações									
		Inicial Maio 1966	Agosto 1966	Dezembro 1966	Abril 1967	Agosto 1967	Dezembro 1967	Março 1968	Setembro 1968	Março 1969	Março 1971
Silo ventilado	Sup.	10,44	-	10,56	9,86	10,41	10,54	9,31	8,99	9,39	9,20
	Inf.	10,44	-	9,47	10,28	10,29	10,51	9,89	9,88	9,80	9,98
Armazém	Sup.	11,14	10,96	10,71	11,95	10,52	11,82	11,00	10,37	9,97	-
	Inf.	11,14	11,40	11,73	13,00	11,21	12,90	11,19	10,83	11,68	-
Silo não ventilado (elevador)	Sup.	10,09	10,79	11,27	11,88	11,67	11,65	11,00	10,70	11,23	-
	Inf.	10,09	10,38	10,13	10,35	10,25	10,38	10,14	9,86	9,79	-

A variação dessa característica no café armazenado a granel, em silo com ventilação natural, revelou ser menos pronunciada comparativamente à do produto guardado em sacas no armazém.

O fato de teor de umidade do café localizado na região superior do silo ter sofrido uma redução ligeiramente maior, explica-se pela migração da umidade na forma de vapor através da abertura superior da célula. O inverso verificado no silo sem ventilação, isto é, sem abertura de saída superior, deve-se ao acúmulo de umidade que, em forma de vapor, se eleva e se concentra nas camadas mais altas de café.

Pêso específico aparente

No Quadro 3, estão indicadas as médias do pêso específico aparente dos grãos de café, segundo os tipos de armazenamento e as datas das determinações, e no Quadro 4, segundo, ainda, a posição da camada de café armazenado.

Os dados do Quadro 3 mostram que houve variação, com tendência para diminuição, do pêso específico aparente do café armazenado em silo com ventilação natural. Comparando-se com aqueles do produto armazenado em silo-elevador, sem ventilação natural, verifica-se que não houve, pràticamente, diferenças significativas entre uns e outros.

Verifica-se, ainda, que nos 20 meses que antecederam o final de armazenamento, (aos 4,5 anos aproximadamente), houve, em média, uma certa estabilidade dessa característica.

Conclui-se, pelos dados do Quadro 4, que a variação com redução do pêso específico aparente foi mais acentuada no café localizado na porção superior da célula, tanto no silo ventilado como no silo-elevador (sem ventilação natural), do que no café da camada inferior. Ademais, a redução do pêso específico aparente foi menos acentuada no café do silo ventilado do que naquele do armazém.

Quadro 3. Médias do pêso específico aparente dos grãos de café, em g/cm^3, segundo os tipos de armazenamento e a data das determinações.

Tipos de armazenamento	Datas das determinações									
	Inicial Maio 1966	Agosto 1966	Dezembro 1966	Abril 1967	Agosto 1967	Dezembro 1967	Março 1968	Setembro 1968	Março 1969	Março 1971
Silo ventilado	0,65	-	0,64	0,58	0,59	0,59	0,59	0,60	0,61	0,61[a]
Armazém	0,65	0,64	0,63	0,52	0,52	0,53	0,52	0,54	0,54	-
Silo não ventilado (elevador)	0,65	0,66	0,64	0,59	0,58	0,58	0,58	0,60	0,61	-

(a) a) Média da camada superior e inferior : 0,61

b) No final do ensaio, obteve-se para a camada do meio, por determinação direta: 0,62.

Quadro 4. Médias do pêso específico aparente dos grãos de café, em g/cm^3, segundo os tipos de armazenamento, a data da determinação e a sua posição no armazenamento.

Tipo de armazenamento e posição da camada do café		Datas das determinações									
		Inicial Maio 1966	Agosto 1966	Dezembro 1966	Abril 1967	Agosto 1967	Dezembro 1967	Março 1968	Setembro 1968	Março 1969	Março 1971
Silo ventilado	Sup.	0,65	-	0,64	0,57	0,58	0,57	0,57	0,57	0,60	0,57
	Inf.	0,65	-	0,64	0,60	0,60	0,60	0,60	0,62	0,63	0,64
Armazém	Sup.	0,65	0,64	0,64	0,54	0,53	0,54	0,56	0,53	0,56	-
	Inf.	0,65	0,64	0,62	0,50	0,51	0,51	0,52	0,54	0,53	-
Silo não ventilado (elevador)	Sup.	0,65	0,66	0,65	0,58	0,56	0,54	0,54	0,57	0,60	-
	Inf.	0,65	0,66	0,64	0,60	0,60	0,61	0,61	0,63	0,62	-

Pêso específico real

No Quadro 5, estão indicadas as médias do pêso específico real dos grãos de café, segundo os tipos de armazenamento e as datas das determinações, e no Quadro 6, segundo, ainda, a posição da camada de café armazenado. Os dados do Quadro 5 mostram que houve uma tendência para diminuição do pêso específico real do café, o qual foi mais acentuado no caso do café em armazém. Conclui-se, pelos dados do Quadro 6, que a redução do pêso específico real foi mais acentuada no café da porção superior dos silos, quer ventilado quer não, do que no café da sua porção inferior. Ademais, essa redução foi menos acentuada nos dois tipos de silos, do que no caso do café em armazém.

Análises químicas dos grãos

No Quadro 7, estão indicados os resultados das análises químicas procedidas em amostras de grãos moídos de café de cada tipo de armazenamento estudado, correspondentes às camadas superior e inferior, e segundo as datas das determinações.

a) Acidez. Os resultados das análises mostram que no silo ventilado, ocorreu uma redução da acidez nos grãos de café da camada superior, durante os primeiros 8 meses de armazenagem, após o que houve um aumento da acidez, que permaneceu mais ou menos estável durante os 9 meses seguintes, para depois aumentar atingindo um máximo no final dos 4,5 anos de armazenamento.

No café da camada inferior, verificou-se um aumento de acidez nos quatro primeiros meses, seguido de diminuição nos quatro meses seguintes. Houve, depois, um aumento da acidez, que permaneceu mais ou menos estável durante cêrca de quinze meses. Com o passar do tempo e até completar mais de 4 anos de início da experiência, houve um aumento gradativo e significativo da acidez.

Quadro 5. Médias do pêso específico real dos grãos de café, em g/cm^3 segundo os tipos de armazenamento e as datas das determinações.

Tipos de armazenamento	Datas das determinações									
	Inicial Maio 1966	Agosto 1966	Dezembro 1966	Abril 1967	Agosto 1967	Dezembro 1967	Março 1968	Setembro 1968	Março 1969	Março 1971
Silo ventilado	1,16	-	1,09	1,12	1,13	1,15	1,13	1,16	1,12	1,08[a]
Armazém	1,16	1,07	1,08	1,03	1,04	1,02	1,02	1,02	1,01	-
Silo não ventilado (elevador)	1,16	1,09	1,10	1,14	1,13	1,11	1,11	1,14	1,09	-

(a) a) Média das camadas superior e inferior : 1,08
b) No final do ensaio -camada mediana -determinação direta : 1,076.

Quadro 6. Pêso específico real dos grãos de café, em g/cm^3, segundo os tipos de armazenamento, as datas da determinação e a posição da camada.

Tipo de armazenamento e posição da camada do café		Datas das determinações									
		Inicial Maio 1966	Agosto 1966	Dezembro 1966	Abril 1967	Agosto 1967	Dezembro 1967	Março 1968	Setembro 1968	Março 1969	Março 1971
Silo ventilado	Sup.	1,16	-	1,09	1,10	1,09	1,12	1,10	1,13	1,10	1,03
	Inf.	1,16	-	1,10	1,14	1,17	1,17	1,15	1,15	1,14	1,13
Armazém	Sup.	1,16	1,07	1,09	1,05	1,06	1,04	1,04	1,03	1,02	-
	Inf.	1,16	1,07	1,07	1,01	1,01	1,00	1,00	1,01	1,00	-
Silo não ventilado (elevador)	Sup.	1,16	1,09	1,10	1,12	1,10	1,06	1,06	1,08	1,03	-
	Inf.	1,16	1,09	1,10	1,17	1,16	1,17	1,16	1,20	1,14	-

Quadro 7. Resultados das análises químicas em amostra de café, calculados na matéria seca.

Tipos de armazenamento	Análises	Camadas	Datas das determinações: Dezembro 1966	Abril 1967	Agosto 1967	Dezembro 1967	Março 1968	Setembro 1968	Março 1969	Março 1971
Silo ventilado	Acidez *	Sup.	90,3	82,8	77,9	101,0	100,1	99,7	110,0	147,4
		Inf.	81,3	119,6	80,3	103,8	102,5	102,0	102,5	141,4
	Nitrogênio %	Sup.	1,63	1,55	1,65	1,61	1,59	1,53	-	-
		Inf.	1,61	1,47	1,57	1,62	1,63	1,47	-	-
	Açúcares totais %	Sup.	8,26	8,23	11,00	11,24	9,92	10,35	-	8,89
		Inf.	8,02	8,33	9,66	10,31	10,47	9,94	-	9,63
	Cafeína %	Sup.	1,16	1,14	1,13	1,15	1,00	1,08	-	1,05
		Inf.	1,16	1,09	1,11	1,16	1,14	1,05	-	1,00
Armazém	Acidez *	Sup	-	115,9	142,6	153,4	107,5	101,6	105,8	-
		Inf.	-	117,2	146,3	146,7	106,7	102,0	103,0	-
	Nitrogênio %	Sup.	1,61	1,57	1,65	1,79	1,65	1,65	-	-
		Inf.	1,64	1,56	1,62	1,78	1,67	1,61	-	-
	Açúcares totais %	Sup.	8,16	8,19	8,75	8,92	9,39	9,38	9,40	-
		Inf.	8,29	8,11	8,06	8,77	9,51	9,39	9,37	-
	Cafeína %	Sup.	1,29	1,14	1,13	1,12	1,12	1,10	1,02	-
		Inf.	1,10	1,21	1,17	1,09	1,12	1,09	0,99	-
Silo não ventilado (elevador)	Acidez *	Sup.	109,3	104,8	140,3	113,5	77,7	73,3	108,3	-
		Inf.	107,5	104,4	138,0	123,6	82,1	76,0	134,4	-
	Nitrogênio %	Sup.	1,64	1,56	1,58	1,70	1,62	1,47	-	-
		Inf.	1,58	1,50	1,56	1,60	1,67	1,38	-	-
	Açúcares totais %	Sup.	8,46	8,44	9,79	8,80	9,65	10,38	10,05	-
		Inf.	8,62	7,87	9,75	8,67	9,84	10,27	10,41	-
	Cafeína %	Sup.	1,13	1,16	1,13	1,12	1,11	1,15	1,04	-
		Inf.	1,13	1,16	1,14	1,08	1,09	1,16	1,13	-

(*) Em ml NaOH 0,1 N/100 g.

Se bem que aparentemente o café da camada superior se mantivesse mais estável que o da camada inferior, observaram-se, em ambos os casos, variações na acidez dos grãos moídos.

Comparando-se os resultados de acidez dos grãos armazenados em silo com ventilação com aquêles dos grãos em silos sem ventilação e em sacas empilhadas em armazém, verifica-se que houve naquele tipo de armazenamento um melhor comportamento de café, quanto à estabilidade, tanto na camada superior como na inferior.

b) Nitrogênio, açúcares totais e cafeína. Em relação a êsses componentes, verifica-se pelos dados do Quadro 7, que houve variações, porém as diferenças observadas não são pràticamente significativas, tanto para o café da camada superior como da camada inferior, assim como dos três tipos de armazenamento.

Análises do óleo

No Quadro 8, estão inseridos os resultados das determinações dos ácidos graxos livres (acidez) e do índice de peróxido do óleo de café, segundo o tipo de armazenamento dos grãos, a posição da camada de grãos e as datas das determinações (tempo de armazenamento).

Conclui-se, pelos referidos dados, que houve aumento gradativo do teor de ácidos graxos livres do óleo com o decorrer do tempo de armazenamento dos grãos de café. Ademais, o café localizado na camada superior apresentou valores mais altos do que aquêle da camada inferior, além dessa elevação ser mais rápida.

O índice peróxido do óleo dos grãos de café, permaneceu pràticamente nulo durante todo o tempo de armazenamento compreendido pelo estudo.

Quadro 8. Resultados das análises químicas do óleo de grãos de café.

Tipos de armazenamento	Análises	Camadas	Datas das determinações							
			Dezembro 1966	Abril 1967	Agosto 1967	Dezembro 1967	Março 1968	Setembro 1968	Março 1969	Março 1971
Silo ventilado	Ácidos graxos livres %	Sup.	3,05	3,56	2,73	3,98	3,58	4,23	4,68	7,68
		Inf.	2,56	2,98	3,55	3,18	3,39	3,94	3,97	4,94
	Índice de peróxido me/kg	Sup.	0	0	0	0	-	0	1,62	0,30
		Inf.	0	0	0	0	-	0	0,81	0,20
Armazém	Ácidos graxos livres %	Sup.	2,65	3,23	3,32	3,69	3,86	3,82	4,33	
		Inf.	2,47	3,36	3,24	3,68	3,66	4,06	4,33	
	Índice de peróxido me/kg	Sup.	0	0	0	0	-	0,40	0,54	
		Inf.	0	0	0	0	-	0,50	0,54	
Silo não ventilado (elevador)	Ácidos graxos livres %	Sup.	2,56	2,86	3,18	3,02	3,78	4,37	4,06	
		Inf.	2,35	2,75	2,94	3,62	3,19	3,82	4,61	
	Índice de peróxido me/kg	Sup.	0	0	0	0	0	0,20	1,08	
		Inf.	0	0	0	0	0	0,19	0,81	

Classificação comercial

No Quadro 9, estão descritos os resultados da classificação comercial dos grãos de café, quanto à côr, à bebida, ao tipo e à peneira, correspondentes à cada tipo de armazenamento e aos tempos de armazenamento.

Quanto à côr, o café do silo com ventilação natural, não transilado, conservou-se durante três anos ou pouco mais, como "esverdeado, levemente manchado". O resultado na conservação da côr, se bem que com pequena alteração, foi melhor do que aquêle de armazenagem em silo-elevador (sem ventilação) e em sacas empilhadas no armazém, particularmente em relação a êste último tratamento.

Após cêrca de 56 meses de armazenamento, o café em silo metálico com ventilação natural, apresentou as seguintes características na classificação comercial, segundo a localização das camadas:

Localização da camada	Côr	Bebida	Tipo
Superior	Amarelo manchado	Dura	5 - 15
Mediana	Esverdeado manchado	Dura	4 - 45
Inferior	Esverdeado uniforme	Dura	4 - 40

Devido à infiltração de água de chuva pela tampa lateral de inspecção do silo, uma pequena proporção de café do fundo da célula apresentava-se deteriorada, pràticamente podre.

Quanto à bebida, não houve alteração. Comparando-a com a do café dos outros dois tipos de armazenamento, verifica-se que os resultados foram idênticos.

Quanto ao tipo de café, verificou-se lijeira desvantagem do silo com ventilação natural quando comparado com o do produto com silo não ventilado, porém houve vantagem sôbre o do café em sacas empilhadas no armazém.

Em relação às peneiras, as comparações periódicas do café dos três tipos de armazenamento, durante aproximadamente três anos, mostraram haver alterações mais acentuadas naquele em sacas empilhadas no armazém, conforme mostram os dados do Quadro 10.

Resumidamente, houve pequena alteração em relação à peneira 13, comportanto-se os três tipos de armazenamento de modo pràticamente igual. Para peneira 14, houve maior alteração no tratamento em armazém, sendo pràticamente desprezível a alteração do produto em silo com ventilação natural. O armazenamento em silo-elevador, sem ventilação, embora apresentasse alteração, ofereceu melhor resultado que o café em sacas empilhadas em armazém. Para peneira 15, houve maior alteração no café em armazém, o melhor resultado sendo em silo sem ventilação. Para peneira 16, houve também maior alteração no café em armazém, a qual foi pequena para o produto em silo sem ventilação. O melhor resultado verificou-se no café armazenado em silo com ventilação. Finalmente, em relação à peneira 17, o resultado mais satisfatório verificou-se no silo com ventilação, ao passo que o menos satisfatório foi no café em sacas empilhadas em armazém.

Após 56 meses de armazenamento em silo com ventilação natural, o café apresentou as seguintes porcentagnes de classificação por peneira, segundo a localização das camadas na célula metálica:

Camadas	Peneiras	%
Superior	14	21,5
	15	43,0
	16	26,0
	17	9,5
Mediana	14	41,5
	15	40,0
	16	18,5
Inferior	14	51,5
	15	37,5
	16	11,0

Análise sensorial

No Quadro 11, estão indicados os resultados da análise sensorial relativa à bebida do café armazenado em silo com ventilação natural, em diferentes épocas.

Infestação de insetos

No Quadro 11, estão indicados os resultados dos exames insetológicos procedidos em amostras de grãos de café armazenados em silo com ventilação natural, nos diferentes tempos de armazenamento. Conclui-se, desses exames, que o número de grãos broqueados era pràticamente desprezível, ainda mais, que já se achavam atacados antes do armazenamento. Não se constatou, durante todo o tempo de armazenamento, qualquer ocorrência de inseto que fôsse prejudicial ao café.

Quadro 9. Classificação comercial dos grãos de café quanto à côr, à bebida e ao tipo, de cada tipo e tempo de armazenamento.

Tipo de armazenamento	Inicial	Após 12 meses	Após 28 meses	Após 36 meses
Silo ventilado	Esverdeado uniforme	Esverdeado levemente manchado	Esverdeado levemente manchado	Esverdeado levemente manchado
	Dura Tipo 4/5	Dura Tipo 4-35	Dura Tipo 5-5	Dura Tipo 5-5
Armazém	Esverdeado uniforme	Esverdeado claro manchado	Esverdeado claro manchado	Esverdeado claro manchado
	Dura Tipo 4/5	Dura Tipo 5-20	Dura Tipo 5-25	Dura Tipo 5-20
Silo não ventilado	Esverdeado uniforme	Esverdeado manchado	Esverdeado manchado	Esverdeado levemente manchado
	Dura Tipo 4/5	Dura Tipo 4-25	Dura Tipo 4-25	Dura Tipo 5

Quadro 10. Classificação do café por peneira, em porcentagem, segundo o tipo e o tempo de armazenamento (Valores médios).

Tipo de armazenamento	Peneira	Tempo de armazenamento			
		0 mês	12 meses	28 meses	36 meses
Silo ventilado	13	6	0	0	0
	14	46	47	50	47
	15	45	39	37	39
	16	11	14	13	14
	17	0	0	0	0
Armazém	13	6	0	0	0
	14	45	21	22	18
	15	40	53	55	52
	16	9	20	19	24
	17	0	6	5	6
Silo não ventilado	13	6	0	0	0
	14	46	36	43	34
	15	45	46	42	42
	16	11	18	15	18
	17	0	0	0	6

Quadro 11. Infestação de insetos no café armazenado em silo com ventilação natural, em diferentes tempos de armazenamento.

Camadas de café no silo		Tempos de armazenamento						
		Dez. 66*	Abr. 67*	Ago. 67*	Dez. 67	Mar. 68	Mar, 69	Mar. 71
Camada superior	Nº de grãos observados	4.384	1.544	1.990	2.166	1.810	500	1.100
	Nº de grãos perfeitos	4.370	1.535	1.980	2.112	1.780	500	1.091
	Nº de grãos broqueados ou danificados por causas diversas	14	9	10	54	30	0	9
	Insetos encontrados	0	0	0	0	0	0	0
Camada inferior	Nº de grãos observados	4.941	1.340	1.969	-	-	-	1.100
	Nº de grãos perfeitos	4.913	1.335	1.963	-	-	-	1.093
	Nº de grãos broqueados ou danificados por causas diversas	28	5	6	-	-	-	7
	Insetos encontrados	0	0	0	-	-	-	0

(*) Exames feitos pelo Instituto Biológico, Fazenda Mato Dentro, Campinas. Os das demais épocas foram feitos pela Seção de Entomologia Aplicada do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo.

Quadro 12. Temperaturas médias da massa do café a granel (*) e do ar ambiente nos diversos períodos das leituras.

Períodos das leituras	De manhã			À tarde		
	Da massa do café		Do ar ambiente	Da massa do café		Do ar ambiente
	Interna	Externa		Interna	Externa	
Verão - 7/3/1966 a 21/3/66	26,0	25,6	22,8	26,7	26,1	24,4
Outono - 22/3/66 a 14/6/66	24,4	22,8	23,3	25,0	23,9	25,0
Inverno - 27/6/66 a 29/9/66	20,6	20,0	20,6	21,1	21,1	22,2
Primavera - 23/9/66 a 22/12/66	22,2	22,2	23,9	22,8	22,8	25,0
Verão - 23/12/66 a 22/3/67	24,4	23,9	24,4	25,0	25,0	27,2
Outono - 27/3/67 a 20/6/67	22,8	21,7	21,7	23,9	23,3	23,9
Inverno - 23/6/67 a 20/9/67	20,0	18,9	21,7	20,6	19,4	23,9
Primavera - 22/9/67 a 21/12/67	23,3	22,8	23,3	24,4	23,3	26,1
Verão - 22/12/67 a 18/3/68	24,4	23,9	23,9	24,4	23,9	26,7
Outono - 22/3/67 a 21/6/68	20,0	18,9	19,4	23,3	22,2	21,7
Inverno - 24/6/68 a 20/9/68	17,2	16,7	17,8	19,4	18,9	19,4
Primavera - 23/9/68 a 22/12/68	20,6	20,6	22,2	22,2	22,2	23,3
Verão - 23/12/68 a 20/3/69	23,9	22,8	25,0	25,0	25,0	26,7
Médias	22,2	21,7	22,2	23,3	22,8	24,4

(*) Médias das leituras de 4 em 4 dias, aproximadamente, durante 3 anos.

CONCLUSÕES

1) O estudo mostrou que é viável o armazenamento de café beneficiado, a granel, com teor de umidade de 10 a 11%, durante um período de 3 anos ou pouco mais, em célula metálica, não hermética, com ventilação natural e sem transilagem.

2) O sistema pode resolver satisfatòriamente o armazenamento de café, tanto nas propriedades rurais pequenas como grandes, sem exigir a aplicação de investimentos fora do alcance do cafeicultor.

3) Pode proporcionar, ainda, melhor preservação das características do produto do que o armazenamento em sacas empilhadas em armazéns. Comparando-se ao sistema de armazenamento em silo não ventilado, sem a prática de transilagem, o resultado é, de modo geral, se não melhor, pelo menos igual.

4) As variações e as alterações físico-químicas do café durante o armazenamento, não comprometem a qualidade do produto, desde que sejam tomadas precauções contra a infiltração de umidade no silo.

5) As alterações do produto armazenado situado na camada superior, quanto à diminuição do teor de umidade, pêso específico, côr tipo e peneira, são mais pronunciadas do que nas demais camadas da massa de café.

6) Com armazenamento por mais de 3,5 anos, o produto da camada superior pode se alterar mais pronunciadamente no aspecto e na côr.

7) Porém, mesmo após 4 anos de armazenamento, não houve alteração quanto à bebida, que permaneceu como a original.

8) A ventilação natural, através da evasão da umidade na forma de vapor pela abertura da parte superior da célula metálica, pode evitar o acúmulo de umi-

dade em determinados locais da massa, particularmente nas camadas mais altas, como geralmente acontece no produto colocado em silo sem ventilação.

9) O sistema com ventilação natural pode proporcionar homogeneização da temperatura na massa do produto armazenado.

10) O sistema oferece, ainda, eficiente proteção contra o ataque de insetos, desde que o produto a ser armazenado se apresente isento de pragas.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/1970

COMPOSIÇÃO DO FRUTO E DO ÓLEO DE DIFERENTES VARIEDADES DE ABACATE CULTIVADAS NO ESTADO DE SÃO PAULO

João Shojiro Tango
Sebastião Irineu da Costa
Aloísio José Antunes
Iovaldo Bueno Figueiredo

RESUMO

Foram estudados, tanto os frutos como os óleos extraídos da polpa, das principais variedades de abacate cultivadas no Estado de São Paulo, com a finalidade de verificar, dentre elas, as que podiam apresentar maiores possibilidades para a indústria de óleos.

Determinaram-se, em cada variedade, tanto o pêso médio por fruto, como as proporções dos componentes casca, polpa e caroço. Foram determinados na polpa, os teores de umidade e de matéria graxa. No óleo extraído da polpa sêca por meio de solvente, foram determinados os índices de iôdo e de saponificação, assim como a proporção de matéria insaponificável e de ácidos graxos. Determinaram-se, também, para algumas variedades, em frutos verdes e maduros, os teores de umidade e de matéria graxa na polpa, assim como a composição do óleo dela obtido.

Os resultados dos estudos mostraram que os frutos das variedades Fuerte, Wagner e Tatuí, eram os mais ricos em matéria graxa, ao passo que os das variedades Ibicaba e Valdim, eram os mais pobres. A composição dos frutos e dos óleos variou muito, segundo a variedade.

SUMMARY

FRUIT AND OIL COMPOSITION OF AVOCADO VARIETIES GROWN IN SÃO PAULO STATE. *Fruit and oil composition of the main avocado varieties grown in São Paulo State were investigate to evaluate those most favourable for oil extraction. The avocados were weight and weight percentages of pit, skin and flesh were determined. In the flesh were determined the moisture and total oil content. In the avocado oil obtained by the solvent extraction were determined iodine value, saponification value, unsaponifiable matter and fatty acids. The changes in moisture, oil content, and fatty acids of the oil in unriped and riped fruits were presented. The results show that varieties Fuerte, Wagner, and Tatuí were richest in oil and the varieties Ibicaba and Valdim with lowest oil content. Fruits and oil composition were very variable according to varieties.*

INTRODUÇÃO

A cultura do abacateiro tem-se expandido no Estado de São Paulo, nos últimos anos, de maneira a ocupar, presentemente, posição de destaque entre as plantas frutíferas de importância econômica. Devido às condições locais favoráveis, a sua cultura continua em franca evolução. Segundo os dados do Instituto de Economia Agrícola da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, os números de abacateiros existentes e as respectivas produções de frutos, foram os seguintes, no quinquênio 1965/1969:

Anos	Nº de abacateiros existentes	Produção de frutos em caixas
	1.000	1.000
1965	567	1.950
1966	610	2.088
1967	734	2.708
1968	734	2.514
1969	920	2.650

O fruto é muito apreciado pelas suas qualidades organolépticas e alimentícias. Durante seis meses aproximadamente, que correspondem ao período de safra das principais variedades, o preço alcançado pelas frutas no mercado é muito baixo, devido à concorrência interna, à inexistência quase total de mercado de exportação e, ainda, à falta de industrialização local para o produto.

Constituindo-se a matéria graxa em um dos principais componentes do fruto do abacateiro, o aproveitamento do óleo pode representar a principal finalidade da sua industrialização.

Êste trabalho teve por objetivo avaliar o fruto e o óleo das principais variedades de abacate cultivadas no Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODO

Os frutos foram colhidos em seu estado máximo de desenvolvimento, utilizando-se, para estudo, apenas aquêles em boas condições. Êstes foram armazenados à temperatura ambiente até o amadurecimento, determinando-se, então, a proporção em pêso dos seus componentes: casca, polpa e caroço. Utilizou-se apenas a polpa para a determinação dos teores de umidade e de matéria graxa, assim como para a extração do óleo.

Para o estudo em frutos verdes, o lote de abacates recém-colhidos foi separado em duas porções, efetuando-se, imediatamente, as determinações em uma delas, enquanto a outra foi armazenada até o amadurecimento dos frutos.

O teor de umidade da polpa foi determinado em estufa, à temperatura de 105-110°C, até pêso constante. O teor de matéria graxa foi determinado na polpa sêca, segundo o método Ac 3-44 da A.O.C.S. (1).

A extração do óleo destinado às análises químicas foi feita de polpas desidratadas, utilizando-se o hexano como solvente. O conteúdo de ácidos graxos livres nas amostras, foi determinado por titulação, pelo método Ca 5a-40 da A.O.C.S. (1).

Os índices de iôdo foram determinados pelo método de Wijs, Cd 1-25, da A.O.C.S. (1); os índices de saponificação pelo método Cd 3-25 da A.O.C.S. (1); e os teores de matéria insaponificável pelo método Ca 6a-40 da A.O.C.S. (1). Os ésteres metílicos foram preparados de acôrdo com o método de Ce 2-66 da A.O.C.S. (1) e as composições de ácidos graxos determinados por cromatografia a gás, utilizando-se ésteres metílicos, de acôrdo com o método Ce 1-62 da A.O.C.S. (1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 estão indicados os dados correspondentes ao pêso médio dos frutos e às proporções de casca, polpa e caroço, em 16 variedades de abacate estudadas.

Pêso médio dos frutos. As variedades Fortuna, Pollock, Linda, Prince, Simonds e Itizana, produzem frutos com pêso médio acima de 500 gramas, ao passo que as variedades Nortropp, Duke e Fuerte, o pêso médio dos frutos é inferior a 200 gramas. Nas variedades Ibicaba, Wagner, Tatuí, Dikaro, Collinson e Valdim, o pêso dos frutos situa-se entre 200 e 500 gramas.

Casca. Os frutos das variedades Itizana, Dikaro, Ana e Prince, possuem mais de 15% de casca, enquanto os das variedades Valdim, Fortuna, Pollock, Simonds, Nortropp e Duke, têm menos de 10%. Nas variedades Linda, Ibicaba, Tatuí, Fuerte, Wagner e Collinson, a porcentagem de casca varia entre 10 a 15%.

Quadro 1. Pêso médio por fruto e proporção dos componentes casca, polpa e caroço, segundo as variedades de abacate.

Variedades	Pêso médio	Casca	Polpa	Caroço
	g	%	%	%
Simonds	530,0	6,9	81,0	12,0
Fortuna	825,0	5,5	80,5	14,0
Valdim	499,5	5,1	79,0	15,8
Pollock	719,7	6,7	78,7	14,6
Ana	-	16,4	73,5	10,0
Ibicaba	336,2	11,9	70,0	18,0
Prince	551,0	15,7	69,3	15,0
Dikaro	364,0	19,2	66,6	14,2
Collinson	458,3	13,3	66,3	20,3
Linda	640,0	10,2	65,0	24,7
Tatuí	356,0	12,7	64,8	22,5
Fuerte	159,0	13,1	63,5	23,4
Duke	141,6	8,8	63,1	28,0
Nortropp	113,5	7,7	62,7	29,6
Wagner	344,0	14,3	62,7	23,0
Itizana	522,0	21,6	60,3	18,0

Polpa. Os frutos das variedades Simonds, Fortuna, Valdim e Pollock, possuem mais de 75% de polpa. Nas variedades Itizana, Wagner, Nortropp, Duke, Fuerte e Tatuí, a polpa é inferior a 65%. Nas variedades Linda, Collinson, Dikaro, Prince, Ibicaba e Ana, o teor situa-se entre êsses limites.

Caroço. Nos frutos das variedades Nortropp, Duke, Linda, Fuerte, Wagner, Tatuí e Collinson, o caroço representa mais de 20% do seu pêso total, ao passo que nas variedades Ana, Simonds, Fortuna, Dikaro e Pollock, é menos de 15%. Nos frutos das variedades Itizana, Ibicaba, Valdim e Prince, o caroço é responsável por 15 a 20% do pêso.

Estão indicados, no Quadro 2, os dados correspondentes às porcentagens de umidade e de matéria-graxa na polpa fresca dos frutos das 16 variedades de abacate estudadas.

Quadro 2. Teores de umidade e de matéria graxa no fruto e na polpa fresca, segundo as variedades de abacate.

Variedades	Umidade	Matéria graxa	
	na polpa fresca	No fruto	Na polpa fresca
	%	%	%
Fuerte	64,9	16,2	25,5
Wagner	70,2	15,2	24,8
Tatuí	67,6	14,3	22,1
Nortropp	74,7	11,3	18,0
Prince	72,7	12,0	17,3
Duke	77,6	10,1	16,1
Ana	75,9	11,5	15,7
Linda	75,0	9,8	15,2
Dikaro	71,6	9,6	14,5
Itizana	73,4	8,7	14,5
Pollock	77,3	10,5	13,4
Collinson	64,8	7,6	11,5
Simonds	79,4	8,3	10,2
Fortuna	83,3	8,2	10,2
Valdim	84,6	5,4	6,9
Ibicaba	84,1	4,5	6,5

Umidade. Os valores mais altos de conteúdo de umidade na polpa, foram encontrados nas seguintes variedades: Valdim, Ibicaba e Fortuna, com 84,6, 84,1 e 83,3%, respectivamente. Os valores mais baixos correspondentes às variedades Collinson, Fuerte e Tatuí, com 64,8, 64,9 e 67,6%, respectivamente. As variedades Duke, Nortropp, Ana, Wagner, Prince, Itizana, Linda, Simonds, Pollock e Dikaro, apresentaram teores de umidade na polpa entre 70 e 80%.

Matéria graxa na polpa. As porcentagens mais altas de matéria graxa na polpa fresca, foram encontradas nas variedades Fuerte, Wagner, Tatuí, Nortropp, Prince e Duke, com 25,5, 24,8, 22,1, 18,0, 17,3 e 16,10%, respectivamente. Por outro lado, as porcentagens mais baixas foram encontradas nas variedades Ibicaba, Valdim e Simonds, com 6,5, 10,2 e 10,2%. As variedades Collinson, Ana, Itizana, Linda, Pollock e Dikaro, apresentam porcentagens de matéria graxa na polpa entre 11 e 16%. O Quadro 2 mostra os dados referentes às porcentagens de matéria graxa na polpa e nos frutos dessas variedades.

Matéria graxa no fruto. Dentre as variedades investigadas, aquelas com frutos mais ricos em matéria graxa foram: Fuerte, Wagner e Tatuí, com 16,2, 15,5 e 14,3%, respectivamente. As variedades com menor quantidade de matéria graxa nos frutos, foram a Ibicaba e a Valdim, com 4,5 e 5,4%, respectivamente. As variedades Duke, Nortropp, Collinson, Ana, Prince, Itizana, Linda, Simonds, Pollock, Fortuna e Dikaro, apresentaram teores de matéria-graxa nos frutos variando de 8 a 12%. No Quadro 3, estão indicados os resultados das determinações de umidade e matéria graxa da polpa e de acidez do óleo, em frutos verdes e maduros das diversas variedades de abacate.

Abacates verdes e maduros. Com o amadurecimento dos frutos, ocorre uma redução no teor de umidade da polpa e, conseqüentemente, há um aumento na porcentagem de matéria graxa na polpa fresca. As

porcentagens de ácidos graxos livres nos óleos extraídos de abacates maduros, foram ligeiramente mais elevadas do que nos óleos extraídos de abacates verdes.

Quadro 3. Teores de umidade e matéria graxa na polpa e porcentagens de ácidos graxos livres no óleo, em frutos verdes e maduros de diversas variedades de abacate.

Variedades	Umidade		Matéria graxa		Ácidos graxos livres	
	Verde	Maduro	Verde	Maduro	Verde	Maduro
	%	%	%	%	%	%
Valdim	86,3	84,6	4,9	6,9	0,93	1,13
Fortuna	83,5	83,3	7,7	10,2	0,80	0,84
Collinson	78,6	77,6	8,9	11,5	0,71	0,63
Duke	78,9	76,3	14,2	17,0	0,23	0,33
Nortropp	76,3	73,0	16,3	19,0	1,00	1,10

Característica química. Os dados do Quadro 4 mostram certas características químicas dos óleos extraídos da polpa dos frutos de algumas variedades estudadas de abacate. Os valores dos índices de iôdo variaram, nos óleos analisados, entre 76,5 e 99,7%; os índices de saponificação, dentro dos limites de 167,7 a 190,1%. As variações das porcentagens de matéria insaponificável situaram-se entre 1,1 e 2,10%.

Composição do óleo. Os dados referentes à composição do óleo encontram-se no Quadro 5. Contém o óleo de abacate, os seguintes ácidos graxos: palmítico, palmitoléico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico, assim como traços dos ácidos mirístico e eicosenóico. O principal componente é o ácido oléico, cuja proporção varia muito, segundo a variedade. Os valores extremos encontrados foram de 71,58%, no óleo da va-

riedade Fuerte, e de 36,92%, no óleo da variedade Valdim. Não foram encontradas diferenças de composição nos óleos extraídos da polpa de frutos verdes e de frutos maduros.

Quadro 4. Características químicas do óleo de diversas variedades de abacate.

Variedades	Matéria insaponificável	Índice de iôdo (Wijs)	Índice de saponificação
	%	%	%
Prince	2,10	81,7	188,6
Nortropp	2,07	99,7	189,0
Wagner	1,92	82,1	178,1
Collinson	1,80	78,5	174,6
Valdim	1,80	84,2	179,5
Fortuna	1,60	80,0	177,4
Simonds	1,55	77,8	177,0
Pollock	1,51	76,8	167,6
Duke	1,39	90,5	187,3
Linda	1,30	81,3	187,4
Tatuí	1,04	76,5	190,1

Quadro 5. Composição em ácidos graxos de óleo de frutos verdes ou maduros de diversas variedades de abacate.

Variedades	Estado de maturação dos frutos	Ácidos graxos							
		C_{14}	C_{16}	C_{16^-}	C_{18}	C_{18^-}	$C_{18=}$	$C_{18^{-=}}$	C_{20^-}
Simonds	Verde	0,05	28,24	7,74	0,62	52,97	9,33	0,96	0,11
	Maduro	0,05	27,52	7,34	0,78	52,11	11,01	1,19	0,10
Valdim	Verde	0,07	29,87	11,36	0,75	36,32	18,99	2,64	Traços
	Maduro	0,05	29,69	11,70	0,70	36,92	18,30	2,64	Traços
Fortuna	Verde	Traços	25,21	2,84	0,95	58,93	11,65	0,42	Traços
	Maduro	Traços	28,81	2,79	1,48	54,59	11,48	0,85	Traços
Collinson	Verde	Traços	25,72	4,96	0,79	56,21	11,52	0,80	Traços
	Maduro	Traços	26,57	5,20	0,67	55,62	11,37	0,57	Traços
Duke	Maduro	Traços	15,38	5,04	0,72	69,08	9,04	0,20	Traços
Nortropp	Maduro	0,30	17,70	4,65	0,30	69,57	6,05	0,25	Traços
Pollock	Maduro	Traços	25,51	9,03	0,48	53,23	10,41	0,93	0,41
Fuerte	Maduro	0,08	15,17	5,10	0,36	71,58	7,41	0,30	Traços

LITERATURA

1. A.O.C.S. Tentative and Official Methods of Analysis. American Oil Chemists Society. Chicago, 1969.

2. ECKEY, E. W. Vegetable fats and oils. Reinhold Publishing Corporation, American Chemical Society, Monograph Series nº 123,New York,836 p., 1954.

3. GIMENES, OTON. El aceite de aquacate. Suelo Tico 7: 221-226, 1953.

4. HAENDLER, L. L'huile d'avocat et les produits dérivés du fruit. Fruits 20: 625-645, 1965.

5. MAZLIAK, P. Les lipides de l'avocat. I. Composition en acides gras des diverses parties du fruit. Fruits, 20: 49-57, 1965.

6. _____. Les lipides de l'avocat. II. Variation de la composition en acides gras de lipides du péricarpe selon la composition de l'atmosphère autour des fruits en maturation. Fruits, 20; 117-122, 1965.

7. MONTANO, G. H., LUH,B.S. et SMITH, L.N. Extracting and refining avocado oil. Food Technology, 16: 96-98, 1962.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/1970

EMPRÊGO DA FARINHA DE MILHO PRÉ-GELATINIZADA EM BÔLO E BOLACHA

Policarpo Vitti

RESUMO

O propósito deste trabalho foi o de estudar o processamento da farinha de milho pré-gelatinizada e a sua utilização no preparo de bolos e bolachas.

Uma das características físicas mais importantes da farinha de milho é o índice de absorção de água. Foram empregados três métodos de determinação: farinográfico, filtração e centrifugação.

Para o preparo dos produtos, foram feitas diluições até 40% em farinha de trigo.

Os resultados mostraram que bolos e bolachas podem ser produzidos com 60% de farinha de trigo e 40% de farinha de milho pré-gelatinizada, sem perder suas características físico-químicas.

Até onde o teste de preferência para bolos diz respeito, os resultados mostraram que não existe diferença significativa entre as amostras preparadas com 10, 20, 30 e 40% de farinha de milho. No caso de bolacha, entretanto, a amostra com 30% de farinha de milho foi a preferida.

SUMMARY

The purpose of the work was to study the processing of pregelatinized corn flour and its utilization in preparing cake and cookie.

One of the most important physical characteristic of corn flour is water absorption index. Three methods of determination were used, viz.: farinograph, filtration, and centrifugation.

For preparing the products dilutions up to 40%, wheat flour were done.

The results shaved that cake, and cookie can be produced from 60 parts of wheat flour and 40 parts of pregelatinized corn flour, without imparting very much the physical and chemical characteristics of them.

As far as the preference test for cakes is concerned the results shaved not to exist significative difference among the samples prepared from 10, 20, 30 and 40% of corn flour. In the case of cookie however the sample with 30 parts of corn flour was prefered.

INTRODUÇÃO

O milho constitui um dos alimentos básicos de grande parte das populações latino-americanas. No Brasil teve sua época de grande consumo humano, porém, com as facilidades da importação de trigo, êsse consumo decresceu. Entretanto, o aumento populacional exigiu maiores importações de trigo e, conseqüentemente, maiores dispêndios de divisas. Outro fato que

ocorreu nos últimos anos, foi o aumento da produção nacional de milho. Tendo em vista êsses dois fatos, uma solução ao problema seria a substituição de parte do trigo pelo milho, quando no uso para o preparo de bolos e bolachas ou pão. Mas, para que essa farinha de milho tenha melhor aproveitamento tecnológico na mistura com a de trigo, faz-se necessário o seu prévio tratamento térmico, conhecido por "pré-gelatinização".

REVISÃO DA LITERATURA

Sabe-se que o grânulo de amido é composto de moléculas (ramificações fracas e lineares) associadas a ligações de hidrogênio, de modo a formarem áreas cristalinas de vários graus de ordem. A fôrça total da rêde micelar é que vai controlar o comportamento do amido em água (1). Sabe-se, também, que os grânulos de amido exibem uma capacidade limitada de absorver água fria. Submetendo-se uma suspensão aquosa de amido à influência do calor ou de agente químico, há enfraquecimento da rêde micelar dentro dos grânulos, por quebra das ligações do hidrogênio. Isso permite a posterior hidratação. Dessa forma, ocorre um intumescimento do grânulo e, com isso, há um aumento no grau de solubilidade e alteração na viscosidade (1).

Com base nesse fato é que a farinha de milho foi submetida a tratamento térmico, que resultou em melhoria nas suas qualidades físicas, principalmente na absorção de água. Ora, no caso de bôlo êsse aumento na capacidade de água é desejável, pois irá ajudar a manter o ar retido, com produção de bolos úmidos e de bom volume. Em bolacha, têm-se as propriedades mecânicas da massa melhoradas.

Em suma, o tratamento térmico da farinha de milho promove as seguintes alterações:

a) aumenta a absorção de água;

b) elimina parte do aroma e gosto do milho;

c) branqueia o produto; e

d) diminui a excessiva gelatinização do amido.

Trabalhos realizados por PEPLINSKI E PFEIFER (2) mostraram o efeito do tratamento de sorgo e de milho com vapor (variando o tempo, a temperatura e a umidade) na absorção de água pela farinha. Os resultados mostraram que o aumento no teor de umidade inicial, no tempo de tratamento e na temperatura, aumentavam o índice de absorção de água.

MATTHEWS e outros (3) procuraram estudar as propriedades da farinha de milho processada por dois diferentes sistemas: por meio de rolos aquecidos e por extrusão a quente.

Os resultados mostraram que, tanto num caso como no outro, o índide de absorção de água pela farinha aumentou.

Com relação ao uso da farinha de milho pré-gelatinizada, pouca referência bibliográfica tem sido encontrada. A maior parte baseia-se no que tem sido feito no "Institute Voon Graan, Meel Brood" TNO, Wageningen, Holanda, na parte relativa ao uso de farinhas compostas para preparo de produtos de confeitaria (5).

MATERIAL E MÉTODO

Preparo da farinha de milho pré-gelatinizada

Para o processamento da farinha de milho, utilizou-se o fubá cremoso obtido na firma "Minasa". Os ensaios foram feitos com três lotes e as determinações, para cada lote, feitas em triplicata.

O equipamento utilizado para a pré-gelatinização foi o "Thermascrew" ou parafuso-térmico, com um tempo de passagem do material de 3 minutos. A temperatura de tratamento foi de 100°C. O fubá, antes de sofrer o tratamento, teve sua umidade ajustada para 22-23%, 24 horas antes do início do processamento. Após a pré-gelatinização, o produto foi levado para secador (com circulação de ar quente), onde foi desidratado até a umidade conveniente. No secador, foi utilizada a temperatura inicial de secagem de 50°C durante 1 hora e meia, 60°C durante 1 hora e meia e 65°C, até atingir o ponto de umidade ideal.

Finalmente, êsse material sêco foi triturado em moinho de martelo, utilizando-se peneira de 1 mm (diâmetro dos orifícios).

Análise química. Foram feitas determinações de umidade, proteína, carboidrato, matéria graxa, cinzas, acidez e pH, antes e após o tratamento. Os métodos de determinação dêsses componentes foram os indicados pela AACC (7).

Análise física. A análise física determinada mais importante, foi o índice de absorção de água pela farinha. Para isso, foram utilizados três sistemas de determinação: papel de filtro (6), farinógrafo segundo método oficial da AACC (7) e centrífuga.

O método da centrífuga consistiu na colocação de 10 gramas de amostra no tubo da centrífuga e na adição de 70 ml de água destilada. Após homogeneizar muito bem, submeteu-se à centrifugação a 1.400 r.p.m.

durante 10 minutos. Após êsse tempo, retirou-se o copo da centrífuga e eliminou-se o sobrenadante, pesando-se o tubo. Calculou-se o índice de absorção de água da farinha por diferença de pêso.

Preparo da bolacha e do bôlo

Para o preparo da bolacha e do bôlo, foram utilizados ingredientes de um lote comum. Com exceção da gordura vegetal, dos ovos e da margarina, os demais ingredientes foram armazenados à temperatura ambiente.

Formulação da bolacha

Componentes	Quantidade	Em relação à farinha
	g	%
a) Farinha	300	100
Gordura vegetal	90	30
Açúcar	90	30
b) Água	Variável	Variável
Sal	0,3	0,1
Bicarbonato de sódio	1,2	0,4
Bitartarato de potássio	1,2	0,4
Bicarbonato de amônia	0,6	0,2

a) Foram utilizadas diluições de farinha de milho pré-gelatinizada em teores de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70 e 80%.

b) As porcentagens de água variaram na proporção de 2% para cada 10% de adição de farinha de milho pré-gelatinizada. Iniciou-se com um teor de água de 20%.

Método para preparo da bolacha. Para o preparo da massa, utilizou-se a batedeira "Kitchen Aid" modêlo K5-A. Misturou-se durante 10 minutos, a baixa velocidade, tôda a gordura e a farinha. Após êsse tempo, colocou-se o restante dos ingredientes e continuou-se a mistura durante mais 2 minutos. A massa obtida foi laminada manualmente por meio de rôlo, até espessura de aproximadamente 0,5 mm. A unidade de bolacha foi obtida por meio de um cortador cilíndrico de 8 cm de diâmetro.

A bolacha foi assada durante 8 a 10 minutos, em forno elétrico (SIAM-ÚTIL), regulado à temperatura de 180°C. O produto, logo após o resfriamento, foi embalado em saco plástico para posterior análise.

Formulação do bôlo

Componentes	Quantidade	Em relação à farinha
	g	%
a) Farinha	300	100
Margarina	225	75
Açúcar	225	75
Ovos	225	75
b) Água	7,5	25
Bitartarato de potássio	1,5	0,5
Bicarbonato de sódio	3,0	1,0

a) Foram utilizadas diluições de farinha de milho pré-gelatinizada de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40%.

b) As porcentagens de água variaram de 2% para cada 10% de adição de farinha de milho pré-gelatinizada.

Método para o preparo do bôlo. Para o preparo da massa, também utilizou-se a batedeira "Kitchen Aid" modêlo K5-A. O método empregado foi o de multiestágio. Primeiramente, foram misturados a margarina e o açúcar, durante 10 minutos, na velocidade 4 (132 r.p.m.). Ôvo e água prèviamente misturados foram adicionados em três porções, a intervalos de 15 segundos. Continuou-se a mistura durante mais 2 minutos, à mesma velocidade. Raspou-se o copo da misturadeira com espátula e adicionaram-se os demais ingredientes secos, prèviamente refinados (peneirados). Misturou-se inicialmente a baixa velocidade e depois na velocidade 4, durante mais 2 minutos. Tomaram-se 400 gramas da massa, que foram colocados em fôrma apropriada que, em seguida, foi para o forno a 180°C durante 15 minutos. O produto, logo após o resfriamento, foi envolvido em saco plástico para posterior análise.

Análises físicas do bôlo e da bolacha

O volume específico da massa de bôlo foi determinada utilizando-se uma placa de Petri de volume conhecido. Após a mistura final dos ingredientes, tomou-se uma quantidade de massa suficiente para encher todo o volume da placa. Com uma espátula retirou-se o excesso. Pesou-se a placa cheia com a massa. O volume específico foi então calculado, dividindo-se o volume em cm^3 da placa vazia pelo pêso em gramas da placa com a massa. O volume específico foi então expresso em cm^3/grama.

Para o produto final foram ainda determinados o pêso e volume (por deslocamento de sementes). O volume específico foi calculado, dividindo-se o volume pelo pêso.

A avaliação sensorial das amostras foi feita utilizando-se o teste de ordenação para sabor.

Para a bolacha foram feitas determinações de pêso e volume, utilizando-se o mesmo sistema anterior usado para bôlo. Para se avaliar o índice de expansão e de crescimento da bolacha, determinou-se a altura de 10 bolachas sobrepostas (medição em centímetros).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, serão discutidos os resultados relativos ao processamento da farinha de milho pré-gelatinizada, indicados nos Quadros 1, 2, 3 e 4.

Primeiramente, os Quadros 1, 2, 3 e 4 dão uma idéia sôbre as características das farinhas e os resultados do processamento térmico da farinha de milho.

No Quadro 1, por exemplo, têm-se os teores de umidade do material que sai do "Thermascrew". Nos três tratamentos, a umidade foi em tôrno de 32%, o que pode ser considerado como valor bom. Após a secagem, a umidade do produto chegou também dentro dos limites desejados, isto é, em tôrno de 11%.

Quadro 1. Dados do processamento no "Thermascrew".

Amostra	Umidade	Umidade antes do tratamento	Umidade após o tratamento	Umidade final
Farinha de milho crua	11,21	-		
Farinha de milho pré-gelatinizada 1 (*)	-	22,10	34,14	10,88
Farinha de milho pré-gelatinizada 2	-	23,10	30,52	10,66
Farinha de milho pré-gelatinizada 3	-	22,70	32,10	11,02
Média		22,63	32,33	10,85

(*) Cada resultado representa a média de três determinações.

Das características físicas das farinhas, talvez a mais importante para identificá-las sob o ponto-de-vista de gelatinização, é o índice de absorção de água. Para êsse teste, foram utilizados três processos de determinação de absorção de água: o farinógrafo, que normalmente é utilizado para farinha de trigo; o método da centrífuga; e o método do filtro (Quadro 2). Na verdade, é difícil haver similaridade da absorção entre os métodos, principalmente entre a da centrífuga e a do filtro, que utilizam a mesma quantidade de material para o teste, porém, dentro de um mesmo método deve haver concordância dos resultados. Na realidade, os resultados mostram que o tratamento alterou as características de absorção de água das amostras, qualquer que tenha sido o método utilizado.

Observa-se, por exemplo, que no caso do farinógrafo, o fubá cru deu uma absorção de 58,0%, enquanto o material, após o tratamento térmico, deu um índice médio de absorção de 61,4%, isto é, 3,4% a mais.

Quadro 2. Índices de absorção de água.

Amostra	Absorção no (*) farinógrafo	Absorção na centrífuga	Absorção na filtração
Farinha de milho crua	58,0	112	280
Farinha de milho pré-gelatinizada 1	60,6	138	320
Farinha de milho pré-gelatinizada 2	61,8	152	320
Farinha de milho pré-gelatinizada 3	62,0	148	320
Média-Farinha de milho pré-gelatinizada	61,4	149	320
Farinha de trigo	58,6	-	-

(*) Cada resultado representa a média de três determinações.

O Quadro 3 mostra a composição química das farinhas. Note-se que o tratamento térmico não alterou, de modo significativo, as características químicas do fubá cru.

Em geral, a composição química das farinhas esteve dentro do normal.

Em relação, ainda, às características das farinhas, pode-se observar, no Quadro 4, a sua granulometria, isto é, a distribuição das partículas de farinha nas diversas peneiras. Igualmente como as características físico-químicas, a granulometria não foi afetada pelo tratamento térmico ou pela pré-gelatinização.

Quanto às características dos produtos bôlo e bolacha, observa-se, pelo Quadro 5, que a diluição da farinha de trigo até o valor de 40% com farinha de milho pré-gelatinizada, não alterou em demasia as características físicas da bolacha. O volume específico situou-se ao redor de 1,55 cm^3/g. Observa-se, até mesmo, que o produto com adições de 5 e 10% de farinha de milho pré-gelatinizada, foi de qualidade ligeiramente superior ao padrão. A explicação para o fato nada mais é que o enfraquecimento provocado no glúten da farinha de trigo. Isto é favorável no caso de processamento de bolacha, pois que se necessita de um produto bem "expandido". Êsse ponto é ainda confirmado pela altura das bolachas em cm (Quadro 5).

As adições de farinha de milho pré-gelatinizada superiores a 40%, já trouxeram problemas de ordem técnica. O processamento da bolacha foi mais difícil porque houve muita quebra e o volume específico baixou consideràvelmente.

Em relação à côr da bolacha, notou-se uma tendência para amarelecimento do seu miolo, à medida que se aumentava a adição de farinha de milho pré-gelatinizada.

Quadro 3. Análise química da matéria-prima e do produto (farinha) processados.

Amostra	Umidade %	Proteína % M.O.	Proteína % M.S.	Carboidrato % M.O.	Carboidrato % M.S.	Mat.graxa % M.O.	Mat.graxa % M.S.	Fibras % M.O.	Fibras % M.S.	Cinzas % M.O.	Cinzas % M.S.	Acidez ml NaOH 0,1 N (Alcoólica)	pH
Fubá cru	11,21	6,84	7,70	76,19	85,80	3,38	3,80	2,38	2,68	0,93	1,04	1,8	5,90
F.M.Preg. 1	10,88	6,89	7,73	76,80	86,17	2,42	2,71	2,08	2,33	0,93	1,04	1,2	5,60
F.M.Preg. 2	10,66	7,12	7,96	77,07	86,26	2,91	3,25	1,25	1,39	0,98	1,09	1,7	5,70
F.M.Preg. 3	11,02	7,67	8,61	75,95	85,35	2,96	3,32	1,26	1,41	1,14	1,28	1,9	5,80
Farinha de trigo	13,85	12,17	14,12	72,07	88,65	0,72	0,83	0,64	0,74	0,55	0,63	0,9	5,70
Média F.M.P.	10,85	7,22	8,10	76,60	85,92	2,76	3,09	1,53	1,71	1,01	1,13	1,6	5,70

Quadro 4. Análise granulométrica das farinhas.

Amostra	Porcentagem de material retido na peneira						
	45	60	6xx	8xx	10xx	15xx	25 Prima
Farinha crua	2,9	4,2	5,6	6,2	33,0	33,7	12,0
Farinha de milho pré-gelatinizada 1	5,8	4,7	7,8	6,9	29,4	28,7	11,4
Farinha de milho pré-gelatinizada 2	5,3	4,6	6,7	6,1	31,9	28,9	11,9
Farinha de milho pré-gelatinizada 3	6,1	5,1	8,1	7,1	30,7	26,8	11,6
Média de farinha de milho pré-gelatinizada	5,7	4,8	7,5	6,7	30,6	28,1	11,6
Farinha de trigo		0,5	2,6	1,9	6,2	29,2	50,0

Quadro 5. Características físicas das bolachas elaboradas com farinha mista contendo procentagens variáveis de farinha de milho pré-gelatinizada.

Amostras	Pêso de 10 bolachas	Volume de 10 bolachas	Altura de 10 bolachas	Volume específico
	g	cm^3	cm	cm3/g
100 % de farinha de trigo	153,4	2,38	6,2	1,55
5 % de farinha de milho pré-gelatinizada	169,7	2,67	6,8	1,57
10 % de farinha de milho pré gelatinizada	162,6	2,53	7,0	1,55
15 % de farinha de milho pré-gelatinizada	149,1	2,27	6,2	1,52
20 % de farinha de milho pré-gelatinizada	153,0	2,35	6,3	1,53
25 % de farinha de milho pré-gelatinizada	155,0	2,40	6,6	1,54
30 % de farinha de milho pré-gelatinizada	154,1	2,38	6,4	1,54
40 % de farinha de milho pré-gelatinizada	153,0	2,36	6,4	1,54
50 % de farinha de milho pré-gelatinizada	152,1	1,93	5,5	1,26
60 % de farinha de milho pré-gelatinizada	129,0	1,70	4,8	1,24
70 % de farinha de milho pré-gelatinizada	128,0	1,40	5,0	1,09

Quadro 6. Características da massa e dos bolos elaborados com farinha mista, contendo porcentagens variáveis de farinha de milho pré-gelatinizada.

Amostras	100% F.trigo	5% F.M.Pré-gel.	10% F.M.Pré-gel.	15% F.M.Pré-gel.	20% F.M.Pré-gel.	25% F.M.Pré-gel.	30% F.M.Pré-gel.	35% F.M.Pré-gel.	40% F.M.Pré-gel
Massa									
Volume específico cm^3/g	1,41	1,37	1,31	1,31	1,29	1,30	1,23	1,23	1,26
Bôlo									
Pêso (g)	344,5	341,5	331,5	342,0	331,5	332,2	340,2	331,5	338,0
Volume (cm^3)	865,0	895,0	855,0	840,0	788,5	760,0	772,5	752,5	747,7
Volume específico cm^3/g	2,51	2,62	2,50	2,45	2,37	2,28	2,26	2,27	2,21
Perda de água no cozimento (%)	13,80	14,60	17,10	14,5	17,1	16,9	14,9	17,1	15,5

As características de sabor do produto também foram avaliadas. Para isso, tomaram-se quatro amostras representativas dos melhores volumes específicos, isto é, com 10, 20, 30 e 40% de adição de farinha de milho pré-gelatinizada. Usou-se êsse intervalo maior, porque as diferenças seriam mais fàcilmente percebidas.

O Quadro 7 mostra o resultado do teste sensorial, no qual se utilizou a ordenação por sabor. O resultado mostra que não havia diferença significativa entre as amostras, havendo, contudo, uma tendência para a amostra feita com 30% de farinha de milho pré-gelatinizada, ser a mais preferida.

Finalmente, em relação ao bôlo, o Quadro 6 mostra as características da massa e dos bolos preparados com adição de quantidades crescentes de farinha de milho pré-gelatinizada. Foram feitas medições de volume específico, tanto da massa crua como do bôlo correspondente. Os resultados mostraram que a tendência era de haver diminuição no volume específico do produto, à medida que se aumentava o teor de diluição. De modo geral, houve uma correspondência entre o volume específico da massa para o produto final, o que era de se esperar.

Também aqui, como no caso de bolacha, as primeiras diluições (até 10%) deram produto de volume específico semelhante ou até mais alto que o do padrão. A explicação para o fato é a mesma anterior, ou seja, quebra do glúten da farinha de trigo através de um produto amiláceo, que é, no caso, a farinha de milho pré-gelatinizada.

A Figura 1 mostra as curvas para volume específico de bolos e bolachas, obtidos com diluições crescentes de farinha de trigo com farinha de milho pré-gelatinizada. As curvas mostram um pêso no ponto em que a adição desta foi de 5%, o que era de se esperar. Depois o volume manteve-se pràticamente constante, para diminuir a partir de 30% de diluição.

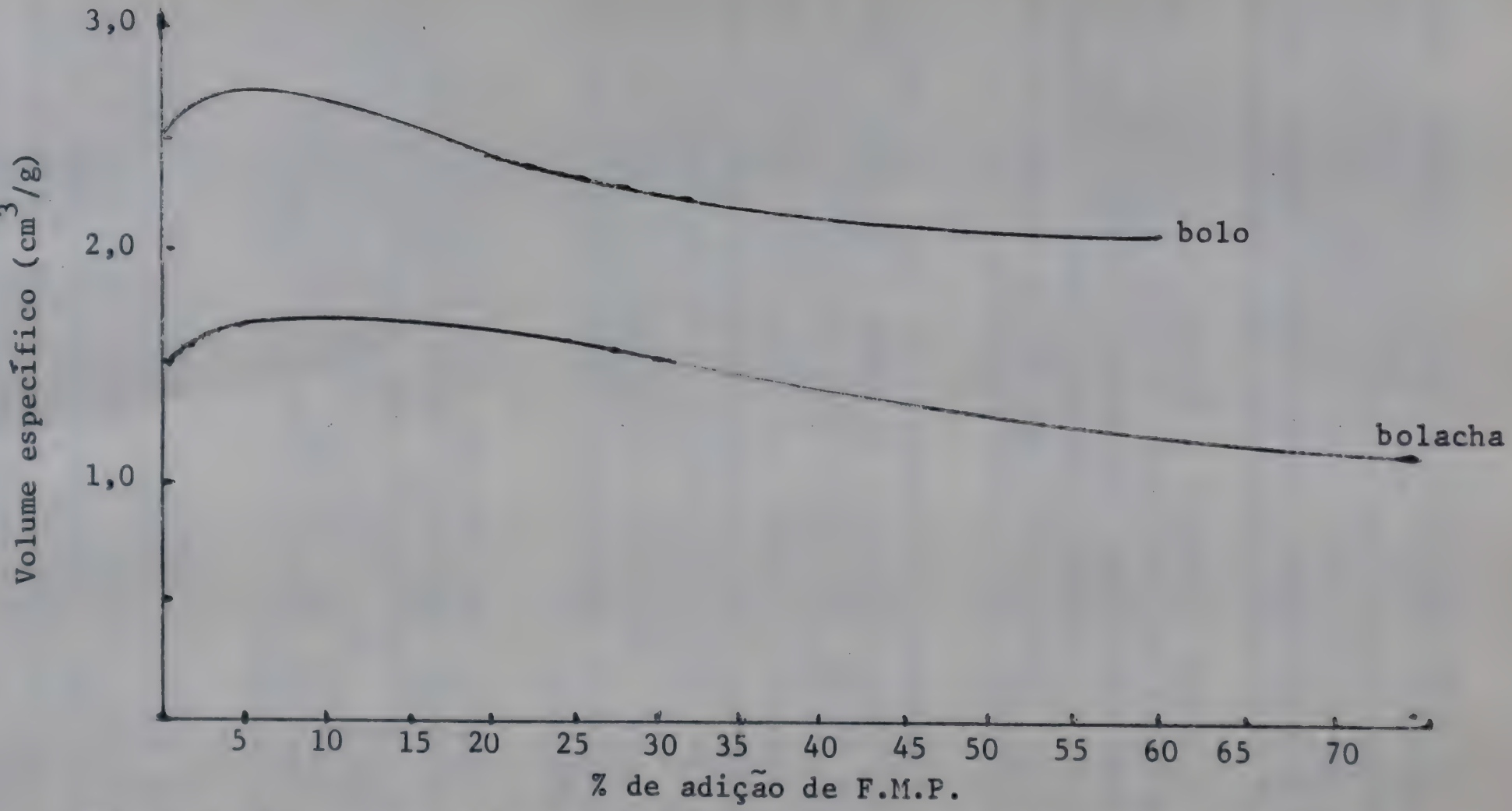


Figura 1. Volume específico de bolos e bolachas obtidos com diluições crescentes de farinha de trigo com F.M.P.

Também foram avaliadas as características dos bolos e, como no caso anterior, utilizou-se o método de ordenação para sabor. O Quadro 8 mostra os resultados do teste. A amostra com 20% de farinha de milho pré-gelatinizada foi rejeitada, pelo seu sabor, ao nível de 5%.

Em relação às demais amostras, não houve diferença significativa em sabor.

Quadro 7. Teste sensorial com bolacha. Ordenação para preferência (sabor).

Provadores	Amostras			
	10% F.M.Pré-gel.	20% F.M.Pré-gel.	30% F.M.Pré-gel.	40% F.M.Pré-gel.
9	26	21	19	24
9	25	20	18	27
18	51	41	37	51

Quadro 8. Teste sensorial com bôlo.
Ordenação para preferência (sabor).

Provadores	Amostras			
	10% F.M.Pré-gel.	20% F.M.Pré-gel.	30% F.M.Pré-gel.	40% F.M.Pré-gel.
10	22	22	23	33
10	19	23	29	29
20	41	45	52	62

Do trabalho realizado, as seguintes conclusões puderam ser obtidas:

a) A pré-gelatinização do fubá (farinha de milho crua) deve ser controlada, de tal modo, que o produto final não tenha índice de absorção elevado, isto é, no caso do farinógrafo, não exceda ao do fubá cru em mais de 4%; no caso da centrífuga, em não mais de 40%; e no caso de filtro, também não mais de 40%.

b) Os parâmetros mais importantes que devem ser controlados para obtenção de um produto com as características antes citadas, são: umidade inicial do produto, antes do tratamento, que não pode ultrapassar de 25%; tempo de tratamento no "Thermascrew" não excedendo de 3 minutos.

c) A adição máxima de farinha de milho pré-gelatinizada em bôlo e bolacha, para não provocar sensíveis alterações no produto final e no seu processamento, é de 40%.

d) Quando se utiliza essa farinha no preparo de bôlo ou bolacha, deve-se ter em mente a modificação a ser feita no teor total de líquido a ser adicionado, visto que o índice de absorção é alterado.

LITERATURA

1. Cereal Laboratory Methods, AACC, American Association of Cereal Chemists. Inc., 7th, edition, Method, 54-21, p. 1-6, 1962.

2. FAO. Composite Flour Programme. Development of bakery products and paste goods from cereal and non-cereal flours, starches and protein concentrates. Documentation Package nº 1. 58-63, 1970.

3. GRAEFE, G. von. Stärke Nr. 11 - 1950 Hamburg. Die Bestimmung des Wasser-bindungmögens von Quellmehlen".

4. KIM, J. C. & RUITER, D. Bakery products from non-wheat flours. A survey of spidy made in the Netherlands Institute for Cereals. Flour and Bread (TWO), Wageningen, Holland. Baker's Digest 43 (3): 58-63, 1969.

5. MATTHEWS, R.H., SHARPE, E.L. & CLARK, W. M. Some functional properties of processed corn meal as related to use in bread, beverages and porridges. Cereal Science Today 15(7):208-210,1970.

6. PEPLINSKI, A.J. & PFEIFER, V.F. Gelatinization of corn and sorghum grits by steam. Cereal Science Today 15 (5): 144-151, 1970.

7. WHISTLER, R.L. & PASCHALL, E.F. *In* Starch Chemistry and Technology. Industrial Aspects. Academic Press, vol. 2, p. 163-170, 1967.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol 3, 1969/1970

DETERIORAÇÃO DA CASTANHA-DO-PARÁ:
I - ARMAZENAMENTO DAS AMÊNDOAS

Fumio Yokoya
Aloísio J. Antunes
Braz Antonio Jordão

RESUMO

Foram realizados experimentos para verificar a condição de armazenamento seguro das amêndoas em casca da castanha-do-pará. O produto pode ser armazenado durante um período tão longo como 6 meses, a 26-28°C e 70% de umidade relativa (R.H.), porém deteriora a 80%. A 97% de R.H. ou mais, as castanhas exibiram crescimento microbiano na superfície, dentro de duas semanas de armazenamento, e desenvolveram aflatoxina após três meses. Isso indicou que o produto mostrando algum sinal de danificação era impróprio para consumo, mesmo como alimento de animais.

SUMMARY

DETERIORATION OF BRAZIL NUTS: I-STORAGE OF SHELLED NUTS. *The experiments were conducted to search the condition for the safe storage of the shelled Brazil nuts. This product could be stored for a period as long as six months at 26°-28°C and 70% relative hymidity (R.H.), but it deteriorated at 80%. At 97% R.U. or higher, the nuts showed microbial growth on its surface within two weeks of the storage and developed aflatoxin after three months. This indicated that the product shaving a sign of spoilage was unsuitable for the consumption even as animal feed.*

INTRODUÇÃO

A castanha-do-pará é um dos produtos de maior importância na economia da região amazônica. Com o desenvolvimento da industrialização, o comércio dêsse produto, na forma de amêndoas, vem ganhando importância cada vez maior.

Êsse produto tem sido motivo de algumas conferências e debates, em que foram apresentadas algumas revisões bibliográficas a respeito (1, 2, 3). Também foram realizados alguns trabalhos de pesquisa sôbre a sua composição química (4, 5, 7, 8, 9) e deterioração microbiana (3). As revisões gerais sôbre o assunto, foram apresentadas, recentemente, por WOODROOF (15), e SOUZA (14). Um trabalho recente, sôbre a importância do armazenamento, foi apresentado por AYERST (1). Entretanto, êsse autor deixou de analisar o problema de armazenamento dêsse produto na forma de amêndoas. Além disso, a temperatura de armazenamento empregada pelo referido autor, foi de 20°C, o que está abaixo da média de temperatura da maioria das regiões do Brasil.

O presente trabalho visa a verificar o comportamento das amêndoas da castanha-do-pará, armazenadas em embientes com diferentes teores de umidade e temperatura de 26°-28°C.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amêndoas da castanha-do-pará foram obtidas rompendo-se a casca das castanhas após a secagem. Aproximadamente, 50% das amêndoas ainda se apresentavam cobertas com a película vermelha. O teor de umidade do produto assim preparado era de 3,3%. As amêndoas foram colocadas em seis dessecadores contendo solução de ácido sulfúrico em concentrações tais

que permitiram a obtenção de umidades relativas de 70,4, 80,5, 88,8, 93,9, 97,5 e 100 por cento, à temperatura de 26°-28°C.

A intervalos regulares, foram removidas as amostras dos dessecadores e feitas as seguintes determinações:

1. Teor de umidade das amêndoas. Foi medido tomando-se uma amostra de aproximadamente 30 g e secando-se durante 14 dias em estufa a 105°C. Como mostra o Quadro 1, houve necessidade de, pelo menos, 12 dias para obter-se a completa secagem a essa temperatura.

Quadro 1. Porcentagem de umidade removida das amêndoas da castanha-do-pará, durante a secagem a 105°C.

Dias de secagem	Amostras					
	1	2	3	4	5	6
1	12,5	10,4	8,0	6,0	5,0	3,8
2	12,7	10,5	8,1	6,2	5,2	3,9
3	12,8	10,8	8,2	6,3	5,3	4,1
5	12,9	10,9	8,3	6,4	5,3	4,1
7	12,9	10,9	8,4	6,5	5,3	4,2
9	13,1	11,6	8,5	6,5	5,5	4,4
12	13,2	11,6	8,5	6,5	5,5	4,4
13	13,2	11,6	8,5	6,5	5,5	4,4
14	13,2	11,6	8,5	6,5	5,5	4,4
15	13,2	11,6	8,5	6,5	5,5	4,4

2. Contagens de fungos e de bactérias. Foram feitas segundo o método recomendado por APHA (13), com a seguinte modificação na semeadura de fungos: a suspensão bacteriana da água de lavagem do produto, após a diluição adequada, foi colocada em alíquotas de 0,1 ml sôbre as placas de Petri contendo meio de malte-ágar solidificado e espalhada com espalhador de vidro.

3. Teor de aflatoxina. Determinou-se pelo método de COOMES e FEUELL (6).

4. Teor de acidez do óleo. Foi determinado conforme o método de AOCS (11) e, o resultado expresso em porcentagem de ácido oléico livre.

RESULTADOS

Como mostra a Figura 1, as amêndoas de castanha-do-pará armazenadas com 3,3% de umidade, em um ambiente de umidade relativa (U.R.) de 70,4%, à temperatura de 26°-28°C, entram em equilíbrio após dois meses, mantendo-se a 4,3%. Em ambientes de U.R. mais elevada, a umidade do produto não entrou em equilíbrio com o ambiente, mesmo após oito meses de armazenamento.

O número total de bactérias e de fungos aumentou após duas a três semanas de armazenamento a 97,5 e 100% de U.R. As amostras colocadas em 88,8 e 93,9% de U.R., apresentaram o início de crescimento das bactérias após dois a três meses de armazenamento, respectivamente. A U.R. de 70,4 e 80,5% não apresentou aumento do número total de bactérias ou fungos, mesmo após oito meses de armazenamento (Quadro 1 e 3).

Nas amostras armazenadas em ambientes de U.R. elevada, o aumento dos números de fugnos e de bactérias precedeu à observação visual da deterioração de amêndoas em cêrca de duas semanas; observou-se o inverso, no caso das amostras armazenadas a U.R. de

88,8 a 93,9% (Quadro 4). No armazenamento a 80,5% de U.R. durante oito meses, não houve aumento nas contagens de fungos ou bactérias, embora tivesse sido observado um crescimento visível de fungos brancos na superfície da amêndoa.

O aumento do teor de acidez do óleo das amêndoas foi paralelo ao aparecimento de fungos visíveis na superfície do produto.

Quadro 2. Variação do número total de bactérias por grama de amêndoas de castanha-do-pará, durante o armazenamento a 26°-28°C, em ambiente com diferentes teores de umidade.

Período de armazenamento	Umidade relativa do armazenamento (%)					
	70,4	80,5	88,8	93,9	97,5	100
Início	270	270	270	270	270	270
1 Semana	245	245	590	220	240	846
2 Semanas	520	500	500	600	1,200	1,840
3 Semanas	250	330	360	1,070	3,570	90,900
4 Semanas	260	270	184	1,500	26,800	$4,3 \times 10^5$
6 Semanas	245	245	750	42,000	$4,9 \times 10^5$	$7,1 \times 10^6$
2 Meses	260	250	7.300	$1,8 \times 10^5$	$5,7 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$
3 meses	260	330	29.000	$2,9 \times 10^5$	$2,5 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$
4 Meses	260	270	69.000	$1,6 \times 10^5$	$7,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$
6 Meses	150	125	13.500	$5,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6$
8 Meses	110	125	10,100	$7,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$4,6 \times 10^5$

Quadro 3. Variação do número de fungos por grama de amêndoas de castanha-do-pará, durante o armazenamento a 26°-28°C, em ambientes com diferentes teores de umidade.

Período de armazenamento	Umidade relativa de armazenamento (%)					
	70,4	80,5	88,8	93,9	97,5	100
Início	C.N	C.N	C.N.	C.N	C.N.	C.N.
1 Semana	C.N.	C.N	C.N	C.N	C.N	C.N
2 Semanas	C.N	C.N	C.N	C.N	C.N	C.N
3 Semanas	C.N	C.N	C.N	12,100	7.230	20,600
4 Semanas	C.N	C.N	C.N	9,300	9,690	$1,3 \times 10^{6}$
6 Semanas	C.N	C.N	C.N	5,450	40,000	$2,6 \times 10^{6}$
2 Meses	C.N	C.N	C N	10,800	$2,4 \times 10^{5}$	$2,0 \times 10^{7}$
3 Meses	C.N	C.N	C.N	$1,1 \times 10^{5}$	$1,7 \times 10^{7}$	$7,5 \times 10^{7}$
4 Meses	C.N	C.N	14.600	$7,5 \times 10^{5}$	$5,4 \times 10^{7}$	$4,6 \times 10^{7}$
6 Meses	C.N	C.N	24,000	$9,8 \times 10^{7}$	$3,8 \times 10^{7}$	-

Quadro 4. Alteração do aspecto externo das amêndoas de castanha-do-pará armazenadas em ambientes com diferentes teores de umidades.

Período de armazenamento	Umidade relativa de armazenamento (%)					
	70,4	80,5	88,8	93,9	97,5	100
Início						
1 Semana	-	-	-	-	-	-
2 Semanas	-	-	-	-	-	-
3 Semanas	-	-	-	-	-	±
4 Semanas	-	-	-	-	±	±
6 Semanas	-	-	-	±	+	+
2 Meses	-	-	±	+	+	+
3 Meses	-	±	±	+	+	+
4 Meses	-	±	+	+	+	+
6 Meses	-	+	+	+	+	+
8 Meses	-	+	+	+	+	+

Geralmente, o óleo das amostras que apresentavam crescimento visível de fungos possuía um teor de acidez livre superior a 1%, expresso em ácido oléico, ao passo que, o das amêndoas "normais", possuiam teores inferiores a 0,5%.

Quadro 5. Teor de acidez do óleo das amêndoas de castanha-do-pará armazenadas em ambientes com diferentes teores de umidade relativa Acidez expressa em porcentagem de ácido oléico livre.

Período de armazenamento	Umidade relativa (%)					
	70,4	80,5	88,8	93,9	97,5	100
Início	0,195	0,145	0,145	0,145	0,145	0,145
3 Semanas	0,29	0,36	0,43	0,36	0,29	0,36
6 Semanas	0,42	0,21	0,28	0,63	1,72	2,39
3 Meses	0,57	0,99	2,12	3,66	9,73	10,44
4 Meses	0,14	0,42	2,96	6,34	21,15	20,86
6 Meses	0,53	1,34	5,67	8,10	12,42	17,36
8 Meses	0,20	1,10	6,63	10,58	25,61	26,79

Além da acidez, as amostras armazenadas em ambientes com teores de umidade de 97,5 a 100% de U.R., apresentaram alto teor de aflatoxina após três meses, que foi desaparecendo com o tempo para ser eliminado, quase que totalmente, após seis meses (Quadro 6). As amostras armazenadas a 88,8 e 93,9% de U.R. também apresentaram alguma formação de aflatoxina após três meses, mas êsse fungo desapareceu nos meses seguintes.

Quadro 6. Teor de aflatoxina das amêndoas de castanha-do-pará armazenadas em ambientes com diferentes teores de umidade.

Período de armazenamento	Umidade relativa (%)					
	70,4	80,5	88,8	93,9	97,5	100
Início	BN	BN	BN	BN	BN	BN
3 Semanas	BN	BN	BN	BN	BN	BN
6 Semanas	BN	BN	BN	BN	BN	BN
3 Meses	BN	BN	Médio	Médio	Alto	Alto
4 Meses	BN	BN	BN	BN	Médio	Médio
6 Meses	BN	BN	BN	BN	BN	BN
8 Meses	BN	BN	BN	BN	BN	BN

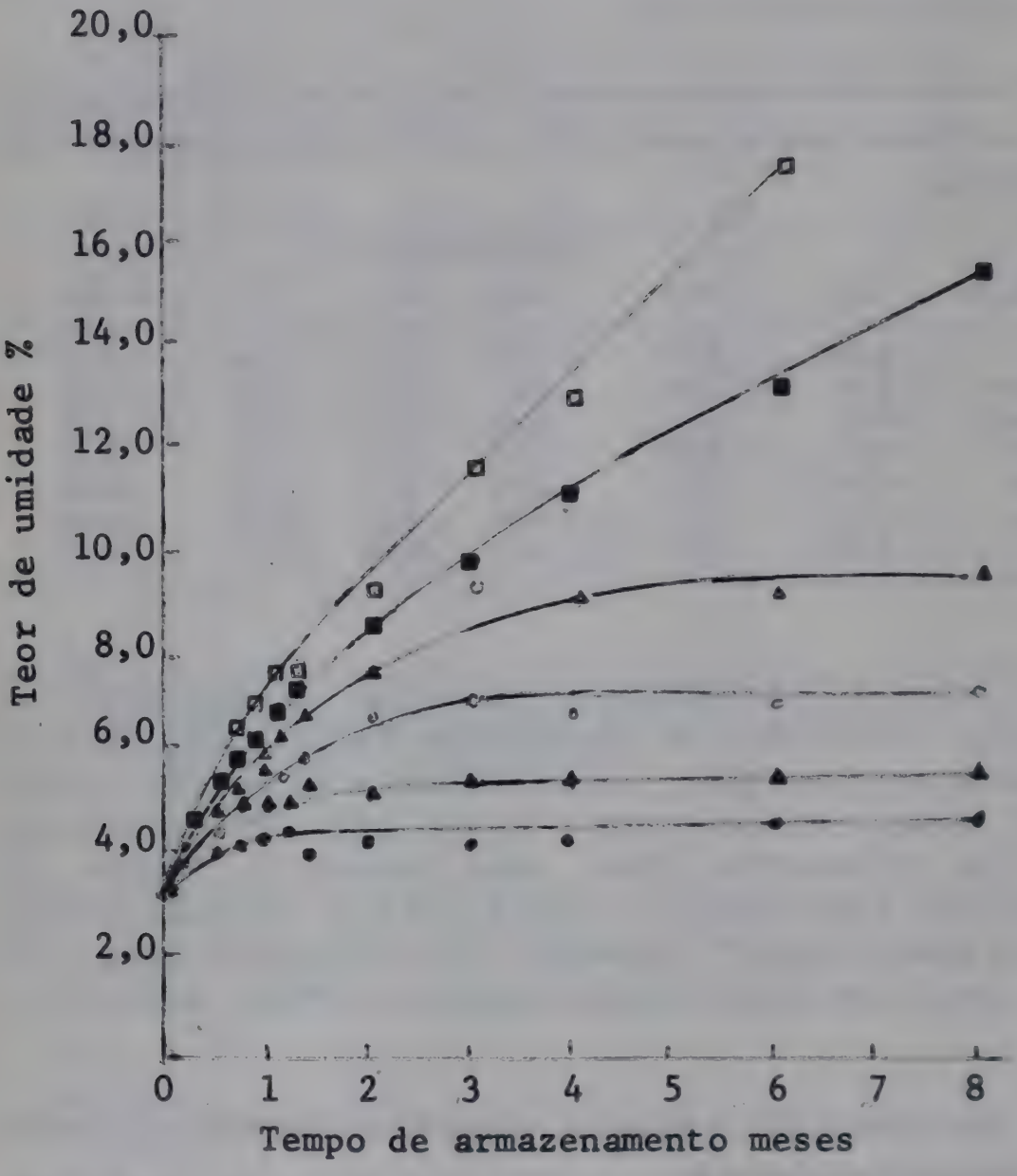


Figura 1. Variação do teor de umidade das amêndoas durante o armazenamento em ambientes com diferentes teores de umidade relativa: (●) = 70,4%; (▲) = 80,5% (0) = 88,8%; (Δ) = 93,9%; (■) = 97,5%; (□)= 100%.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados dêste trabalho mostraram que o armazenamento das amêndoas de castanha-do-para, à temperatura de 26°-28°C, só poderá ser feita com segurança em ambientes de umidade relativa inferior a 70,0%. Nessas condições, o produto pode ser armazenado por período de oito meses, ou talvez mais, sem o perigo de alterações indesejáveis de caráter microbiológico ou químico. Isso está de acordo com os resultados de AYERST (1) para o armazenamento da castanha-do-pará em casca.

As amêndoas apresentaram um teor de umidade de 4,3% após o equilíbrio com o ambiente de 70,4% de U.R., à temperatura de 26°-28°C. Segundo a literatura, as amêndoas de castanha-do-pará entram em equilíbrio com 5,1% a 70,0% de U.R., à temperatura de 20°C. Êsse último valor, mais elevado que os resultados obtidos no laboratório do ITAL provàvelmente é devido à influência da casca das castanhas.

As amêndoas não devem ser armazenadas em ambientes com teor de U.R. superior a 95,0%, mesmo por um período curto de duas a três semanas. Observa-se, nessas condições de armazenamento, um aumento considerável do número de bactérias e fungos, precedendo de quase duas semanas ao aparecimento da deterioração visível. O teor de umidade das amêndoas nestas condições, não foi superior a 60%. Entretanto, a umidade na região da periferia das amêndoas deve ser superior ao valor acima, uma vez que o produto se encontra na fase de incorporação da umidade. O crescimento de fungos foi observado na superfície das amêndoas com 5,5 a 6% de umidade, mas sòmente após três meses de armazenamento. Isso ocorreu com as amostras armazenadas em ambientes de U.R. de 80,5%, que não apresentaram aumento no número de fungos ou bactérias, contados pelas técnicas aqui descritas.

Juntamente com o crescimento de fungos e bactérias, houve aumento da acidez no óleo extraído das amêndoas. Essa acidez, que normalmente é inferior a

0,5% (expresso em ácido oléico), com o desenvolvimento dos microrganismos passou a ser superior a 1,0%, atingindo até quase 27% nas amostras armazenadas a 100% de U.R. por oito meses.

Quando o fungo apresentava um crescimento exuberante na superfície das amêndoas, observou-se o aparecimento de aflatoxina. Isso ocorreu nas amostras armazenadas à umidade relativa de 88,8%, ou mais, por três meses. Não houve aparecimento da aflatoxina, quando o crescimento do fungo foi apenas moderado, indicando que êsse produto não é um material propício à síntese da toxina pelos fungos. Contudo, a inclusão de amêndoas deterioradas, em produtos como farinha e creme de castanha, pode resultar em alimentos contendo a referida toxina. Também a utilização de castanhas com "mofo" na alimentação de animais pode causar uma intoxicação hepática.

LITERATURA

1. AYERST, G. Jour. Food. Sc. Agric. 7, 390, 1960.

2. Bases para a política nacional da castanha. Comissão Especial da Castanha, Rio de Janeiro, 73 p., 1967.

3. BITANCOURT, A.A. O Biológico II, 303, 1941.

4. BORGES, P. & PECHNICK, E. Estudos sôbre a castanha-do-pará. Arq. Bras. de Nutrição 1, 12,1950.

5. CHAVES, N. Primeira Conferência da Castanha-do-pará. Comissão Especial da Castanha. Rio de Janeiro, 21 p., 1967.

6. COOMES, T.J. & FEUELL, A. J. Trop. Prod. Inst. Report G13, Ministry of Overseas Development, Inglaterra, 24 p., 1965.

7. COSTA, D. & FONSECA, H. P. Rev. Bras. Medicina 8, 544, 1951.

8. _____, _____. Primeira Conferência Nacional da Castanha do Pará, Comissão Especial da Castanha, Rio de Janeiro, 11p., 1967.

9. COSTA, E. & MOTA, S. Cultura Médica 4, 18, 1942.

10. MENEZES, T.J.B. A castanha-do-pará na indústria de alimentos. Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos 9, 23, 1967.

11. Official and Tentative Methods of American Oil Chemistry Soc., Chicago, III, E.U.A., 1964.

12. PANDOLFO, C. Castanha do Pará e seu beneficiamento. 1º Encontro de Investigadores da Amazônia, SUDAM, 16p., 1966.

13. SHARF, J.M. Recommended methods for the microbiological examination of foods, 2a. Ed. Ame. Public Health Assn., Washington, D.C., E.U.A., 205 p., 1966.

14. SOUZA, A.H. Castanha-do-Pará - Estudo botânico, químico e tecnológico. Serviço de Informação Agrícola, Min. da Agricultura, Estudos Técnicos nº 23, 69 p., 1963.

15. WOODROOF, J. G. Brazil Nuts. *In* Tree Nuts: Production and Processing the Products. Vol. 1, p. 183, The AVI publng. Co., Westport, Conn., E.U.A., 1967.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/1970

FARINHA DE MILHO PRÉ-GELATINIZADA EM PASTAS ALIMENTÍCIAS

Renato F. Leitão
Policarpo Vitti
Eidiomar Angelucci
João S. Tango

RESUMO

Este trabalho foi realizado para estudar a utilização da farinha de milho pré-gelatinizada em pastas alimentícias, a vários níveis de diluição. A pré-gelatinização da farinha de milho foi obtida submetendo-a ao tratamento a vapor. O tipo de massa foi "spaghetti", sem alteração no seu processamento. Até 30% de diluição, os produtos não mostraram alteração nas suas características. Concluiu-se que é possível obter-se massa alimentícia de boa qualidade com farinha mista, utilizando-se farinha de milho até aquela diluição.

SUMMARY

PRE-GELATINIZED CORN FLOUR IN MACARONI. *The work was carried out to study the utilization of pre-gelatinized corn flour in macaroni, at several levels of dilution. Pre-gelatinized corn flour was obtained by submitting corn flour to steam treatment. The product produced was of spaghetti type with no alteration on its manufacturing procedure. Up to 30% of dilution the products shawed no alteration on its characteristics. The conclusion was that it is possible to manufacture good macaroni with composite flour utilizing corn flour up to 30% in the dilution.*

INTRODUÇÃO

O milho constitui um dos alimentos básicos de grande parte da população latino-americana. No Brasil, já teve época de grande consumo humano, mas com as facilidades de importação do trigo, sua utilização para essa finalidade diminuiu. Entretanto, o crescimento demográfico do País, vem exigindo, cada vez mais, maiores importações de trigo e, conseqüentemente, maiores dispêndios com divisas.

O fato que vem ocorrendo, nos últimos anos, é o aumento da produção de milho. Recentes estimativas realizadas por órgãos técnicos do Ministério da Agricultura, mostraram que a produção brasileira de milho, em 1970, alcançou a cifra de 15,6 milhões de toneladas, ou seja, 21,67% superior àquela de 1969, que foi de 12,8 milhões de toneladas. Isso coloca o Brasil nas estatísticas internacionais como segundo produtor mundial de milho, embora sua produção seja quase oito vêzes menor que a dos Estados Unidos, que tradicionalmente desfrutam a liderança como primeiro produtor. O que acontece, no Brasil, é que o rendimento da cultura é relativamente baixo. Felizmente, essa falha está sendo encarada com muita atenção, já se fazendo sentir, nos últimos cinco anos, sensível melhoria de rendimento agrícola do milho em nosso País. Assim sendo, chega-se à conclusão de que há necessidade urgente de se incentivar o consumo nacional do milho na alimentação humana, bastando lembrar que em muitos países da América Latina, especialmente na Colômbia, no Equador e no México, o consumo de milho e de seus subprodutos é maior do que no Brasil, pois ali é utilizado em grande escala na panificação. A importância do presente trabalho baseia-se, portanto, na possibilidade do uso mais generalizado da farinha de milho na alimentação humana, podendo disso resultar maior saldo de divisas para outros setores da economia nacional, com a redução ou, pelo menos, a estabilidade da importação de trigo, em favor, como dizem muitos nutricionistas, de uma melhor, mais forte e mais econômica alimentação popular.

MATÉRIA-PRIMA

Ao lado da semolina de trigo, a farinha de milho pré-gelatinizada foi a matéria-prima mais importante no preparo de macarrão.

Convém salientar que a farinha de milho para uso em macarrão necessita de ser submetida a um tratamento físico, denominado de pré-gelatinização, que a deixa com qualidades físicas para a finalidade a que se destina. O processamento da farinha de milho pré-gelatinizada baseou-se em trabalhos de PEPLINSKI e PFEIFER (5). Farelões de milho e de sorgo foram tratados por vapor, procurando-se observar as alterações de suas propriedades físicas, tais como viscosidade e índice de absorção de água.

Outro trabalho, que também serviu como base, foi o de MATTHEWS, SHARPE e CLARK (4), que estudaram as propriedades de duas farinhas tratadas de milho, obtidas por dois processos, comparadas com as da farinha não tratada, seguintes:

a) Processamento em rolos aquecidos, com 13% de umidade;

b) Processamento por sistema de extrusão, com 7% de umidade;

c) Farinha sem tratamento, com 8% de umidade.

Essas farinhas foram empregadas no preparo dos pães nas proporções de 5, 15 e 25%, em substituição à farinha de trigo.

Os resultados mostraram que a farinha de milho tratada dava maior índice de absorção que a farinha não tratada.

A massa de pães feita com 5 e 15% de farinha de milho tratada, mostrou-se mais tolerante à ação mecânica do processamento do pão do que aquela feita com farinha de milho não tratada.

Pães elaborados com farinha de milho de menor grau de gelatinização foram melhores do que aquêles de farinha de milho de maior grau de gelatinização.

Em relação ao uso de farinha de milho pré-gelatinizada em pastas alimentícias, pouco ou quase nada existe publicado. Desse modo, os experimentos deste trabalho foram baseados nas publicações sôbre o processamento do macarrão descritos por HUMMEL (3), FERRER (2) e PORTESI (6).

A farinha de milho pré-gelatinizada obtida no ITAL, foi de acôrdo com o seguinte esquema:

1. Umedecimento da farinha de milho comum até o teor de 23 a 24%;

2. Passagem da farinha no "Therma-screw" à temperatura de 100°C, com injeção direta de vapor na camisa e tempo de passagem do material, de 3 minutos, desde a entrada até a sua saída do aparelho;

3. Complementação da pré-gelatinização durante 10 minutos em meio embiente;

4. Secagem a 60°C até obter a umidade final do produto ao redor de 11-12%;

5. Moagem em moinhos de martelo refrigerado a água, usando-se peneira de 0,5 mm.

Em relação ao trigo, foi utilizado, no presente trabalho, a semolina de trigo proveniente do moinho São Paulo.

Características das matérias-primas

Para produção das pastas alimentícias, foram preparadas com a semolina de trigo e a farinha de milho pré-gelatinizada várias formulações, de acôrdo com as seguintes proporções:

Formulações	Semolina	Farinha de milho pré-gelatinizada
	%	%
A	100	0
B	80	20
C	70	30
D	60	40
E	50	50
F	40	60

A seguir, foram caracterizadas quìmicamente essas formulações, sendo os resultados aquêles indicados no quadro 1.

Quadro 1. Características químicas das misturas de semolina de trigo e farinha de milho pré-gelatinizada.

Análises (*)	A	B	C	D	E	F
Proteínas	13,00	11,67	11,37	10,36	10,04	10,07
Carboidratos	85,81	86,99	87,11	88,03	88,25	88,02
Matéria graxa	0,65	0,72	0,74	0,79	0,87	0,97
Fibras	0,17	0,25	0,41	0,44	0,46	0,51
Cinzas	0,37	0,37	0,37	0,38	0,38	0,43

(*) Referentes à matéria sêca; determinação segundo método da AOAC (1).

No Quadro 2, estão indicadas as características físicas das misturas empregadas para produção das pastas alimentícias, obtidas da sua análise farinográfica.

Quadro 2. Características físicas das misturas de semolina de trigo e farinha de milho pré-gelatinizada.

Misturas	A(*)	T.D.M.	E.M.	R.M.	ABR.
A	52,0%	1 min	5 1/2 min	6 1/2 min	30V.F.
B	53,6%	2 min	1 1/2 min	3 1/2 min	70V.F.
C	53,8%	2 1/2 min	1 1/2 min	4 min	80V.F.
D)					
E)	não deram leitura				
F)					

(*) A = Absorção de água pela massa; T.D.M. = Tempo de desenvolvimento da massa; E.M. = Estabilidade da massa; R.M. = Resistência da massa; ABR = Abrandamento da massa; U.F. = Unidades farinográficas.

PREPARAÇÃO DO PRODUTO

Os equipamentos utilizados para a preparação do produto foram:

1. Misturador das farinhas que serviram como matéria-prima;

2. Prensa Zambra-Braibanti com capacidade de 40-50 kg/hora, dotada de trefila de bronze-nylon;

3. Secador Braibanti BR/2 "Special", com capacidade de ar de 100-120 kg.

Para a elaboração dos produtos em questão, inicialmente foram feitas as misturas das farinhas de semolina de trigo e farinha de milho pré-gelatinizada nas proporções já mencionadas. O tempo de mistura para tôdas as farinhas foi de 10 minutos, para que permitisse uma melhor incorporação dos materiais farináceos.

A primeira fase do processamento foi a hidratação do material farináceo, seguindo-se de uma homogeneização. Terminada esta, o material foi colocado num condutor, onde uma rosca-sem-fim de aço inoxidável levava a massa para ser comprimida de encontro à matriz, de onde saía o produto trefilado em sua forma desejada.

Após a trefilação, o material foi cortado e distribuído em varetas, e colocado em carrinhos de onde era conduzido ao secador.

No secador, o macarrão foi submetido à secagem que foi dividida em três fases:

1. Encartamento;

2. Descanso geral;

3. Secagem pròpriamente dita.

Na primeira fase, submete-se o produto a uma secagem um pouco forçada, com a finalidade de:

1. Permitir melhor distribuição de umidade na superfície do produto;

2. Dar maior consistência ao formato;

3. Frear a ação enzímica que se inicia com a hidratação;

4. Reduzir a ação microbiológica; e

5. Reduzir o tempo de secagem definitiva.

À fase do descanso geral, sucede-se a fase do encartamento, que apresenta como finalidade primordial estabelecer o equilíbrio de umidade entre as partes interna e externa do produto.

Finalmente, a secagem definitiva tem como objetivo a retirada gradual da umidade do produto até que êle atinja a sua umidade final ideal. A temperatura de secagem na fase do encartamento foi de 35-40°C e, na fase de secagem definitiva, de 28-30°C, com tempo de secagem total entre 28 e 30 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acôrdo com o Quadro 3, as pastas alimentícias apresentaram os dados ali inseridos.

Quadro 3. Resultados das análises químicas das pastas alimentícias obtidas de cada formulação de farinha.

Análises (*)	A	B	C	D	E	F
Proteína	12,13	10,91	10,95	10,54	10,28	10,17
Carboidratos	86,86	88,11	87,56	87,83	87,90	87,88
Matéria graxa	0,34	0,34	0,74	0,80	0,88	0,94
Fibra	0,32	0,30	0,36	0,40	0,56	0,68
Cinzas	0,35	0,34	0,39	0,43	0,38	0,52

(*) Referentes à metéria sêca.

Os dados do Quadro 4 mostram os resultados das análises físicas dos produtos quanto ao teste de cozimento.

Quadro 4. Resultados das análises físicas das diferentes pastas alimentícias quanto ao teste de cozimento.

Análises	A	B	C	D	E	F
Coeficiente de aumento de volume	3,25	3,20	3,15	3,10	3,10	3,10
Tempo de cozimento	12 min	13 min	15 min	15 min	17 min	18 min
Resistência ao colamento	Normal	Normal	Normal	Normal	Ligeiramente pegajoso	Ligeiramente pegajoso

O Quadro 5 mostra os dados da análise sensorial do macarrão elaborado com as seis diferentes pastas alimentícias.

Quadro 5. Resultados da análise sensorial das macarroes elaborados com as seis formulações de pastas alimentícias.

Pastas alimentícias	Sabor	Textura	Preferência
A	6,44	6,48	6,30
B	6,42	6,31	6,39
C	6,22	5,94	6,13
D	6,54	5,85	5,47
E	6,04	5,49	5,72
F	5,54	5,26	5,30

No trabalho aqui descrito, procurou-se verificar o comportamento dos diversos tipos de macarrão elaborados de pasta alimentícia de diversas formulações provenientes de mistura de semolina de trigo e de farinha de milho pré-gelatinizada. Êsse comportamento compreendia desde a elaboração dos produtos durante a secagem, até a sua análise química, física e também sensorial.

Durante o processamento, pôde-se verificar que até a mistura de 70% de semolina de trigo e 30% de farinha de milho pré-gelatinizada, a adição de água foi feita com base nos valores dados pelo farinógrafo. Após essa proporção de farinha de milho pré-gelatinizada, em virtude de não se conseguir interpretação do farinograma, a adição da água foi feita mais ou menos até o ponto em que a massa conseguia a sua hidratação para ser processada.

Nas fases de homogeneização, trefilação, corte e estendimento do macarrão, nenhuma anomalia no processamento foi verificada. Na fase de secagem, foi notada, porém, grande perda por quebra dos macarrões, a partir da formulação contendo 50% de semolina de trigo e 50% de farinha de milho pré-gelatinizada.

De acôrdo com as caracterizações químicas, os resultados encontrados nos produtos não apresentaram, de modo algum, variações sensíveis, sendo que os valores obtidos foram aquêles esperados.

Em relação às características físicas dos produtos, pode-se notar, pelos dados do Quadro 4, pouca diferença em relação ao coeficiente de aumento e às melhores amostras, sendo aquelas designadas de A, B e C.

Quanto à resistência ao colamento, as amostras A,B,C e D,pouco diferiram entre si, sendo as suas características consideradas normais.

Em relação ao tempo de cozimento dos produtos, verificou-se que os tempos aumentavam à medida que a proporção de farinha de milho pré-gelatinizada aumentava.

No que se refere à análise sensorial dos produtos, foram realizados testes de qualidade, usando-se escala de 1 a 10 para sabor, textura e preferência. A preferência foi por ordenação.

Os produtos foram avaliados sensorialmente, utilizando-se o delineamento estatístico em blocos incompletos, sendo $t = 6$; $k = 4$, $r = 10$; $b = 15$; $\lambda = 6$; e $E = 0,90$.

Em relação à análise sensorial, pode-se dizer que, as melhores amostras foram A, B e C, que não diferiram entre si, alcançando média correspondente a sabor ligeiramente bom, da escala pré-estabelecida.

Em relação à textura, a amostra A foi a melhor, tendo alcançado uma média correspondente à textura macia, não diferindo, porém, significativamente, da amostra B, que alcançou média correspondente à textura ligeiramente macia; diferiu das demais ao nível de 1%. Quanto à preferência, não houve diferença significativa apenas entre as amostras A e B, que alcançaram médias correspondentes à textura ligeiramente, diferindo das demais ao nível de 1%. Na avaliação sensorial de preferência, feita pelo método de ordenação, as amostras foram agrupadas em:

Amostras A e B, as mais preferidas;

Amostras C e D, intermediárias;

Amostras E e F, as menos preferidas.

CONCLUSÃO

Do presente trabalho, conclui-se que é possível a adição de farinha de milho pré-gelatinizada à semolina de trigo nas proporções de até 60%. Entretanto, do ponto-de-vista de qualidade e sabor, a adição até 30% de farinha de milho pré-gelatinizada pode ser considerada como satisfatória.

Tecnològicamente, o processamento de macarrão não sofreu alteração quanto à adição de farinha de milho pré-gelatinizada à semolina de trigo.

LITERATURA

1. CEREAL LABORATORY METHODS. American Association of Cereal Chemistry, 7th ed., 1962.

2. FERRER, R. & RENON, N. Fabricacion de pastas alimentícias. Editor Serralina y Urpi S.L., 242 p. Barcelona, 1950.

3. HUMMEL, C.H. Macaroni products. Food Trade Press Ltd. 2a. Edição, 273 p. 1, Londres, 1966.

4. MATTHEWS, R.H., SHARPE, E. J. & CLARK, V.M. Some functional properties of processed corn meal as related to use in bread, beverages and porridges. Cereal Sci. Today 15 (7): 208-210, 1970.

5. PEPLINSKI, A.J. & PFEIFER, V.F. Gelatinization of corn and sorghum grits by steam-cooking. Cereal Sci. Today 15 (5): 144-151, 1970.

6. PORTESI, G. L'Industria della pasta alimentare. Ed. Molini D'Italia, 430 p. 1 Roma, 1957.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/1970

COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE DE SINTETIZAR AFLATOXINA ENTRE VÁRIOS FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS*

Hatuê Nakamura
Fumio Yokoya

RESUMO

Quarenta e uma linhagens de fungos do gênero Aspergillus *foram isoladas de várias fontes naturais do Estado de São Paulo. A capacidade de produzir aflatoxina por essas linhagens foi comparada à de linhagens de alta produção, selecionadas nos Estados Unidos e na Inglaterra.*

As linhagens alienígenas produziram apreciável quantidade das aflatoxinas B e G, mas aquelas de São Paulo produziram, principalmente, aflatoxina B. Uma linhagem do Texas, E.U.A., foi a melhor produtora de toxina entre as linhagens importadas, com 2,135 mg por 50 ml de meio. Nossa melhor linhagem produziu 2,553 mg por 50 ml de meio, o que foi a maior quantidade obtida. Entretanto, essa quantidade foi um pouco menor que a maior quantidade relatada por DAVIS e outros. Essa diferença pode ser devida à diversidade do meio e das condições de crescimento e manutenção da cultura.

SUMMARY

COMPARATIVE CAPACITY OF SINTHETIZING AFLATOXIN OF VARIOUS STRAINS OF *ASPERGILLUS*. *A total of 41 strains of* Aspergillus *fungi were isolated from several*

natural sources of the State of São Paulo, Brasil. The ability to produce aflatoxin by these strains was compared with the high producing strains selected in the United States and England.

The foreign strains produced appreciable amount of the aflatoxins B and G, but the strains from São Paulo produced mainly the aflatoxin B. A strain from Texas, U.S.A. was the best toxin producer among imported strains, with 2.135 mg per 50 ml medium. Our best strain produced 2.553 mg per 50 ml medium, which was the largest amount that we obtained. These were somewhat less than the largest amount reported by DAVIS et al. This difference may by due to the difference in media and the conditions of growth and mantenance of the culture.

INTRODUÇÃO

A aflatoxina foi descoberta na Inglaterra, em 1961, quando um grande número de aves e outros animais morreram, inexplicàvelmente. Ela é uma mistura de metabólitos secundários de vários fungos do gênero *Aspergillus* e também de *Penicillium puberulum*. Seu nome proveio do agente produtor primeiramente isolado, *Aspergillus flavus*, que contaminava o amendoim (3). Recentemente, ela tem sido assunto de considerável interêsse de vários pesquisadores, devido à sua alta toxicidade e grande ocorrência em diversos produtos alimentícios (7).

No Brasil, onde as condições favorecem o desenvolvimento do agente produtor, a aflatoxina constitui sério problema. Tanto é, que foi constatada grande incidência e altas concentrações nos nossos amendoim e produtos derivados (11, 6), representando prejuízos aos produtores e também perigo aos consumidores.

Numerosos estudos evidenciam que a habilidade de produzir essa toxina varia de linhagem para linhagem, sendo também influenciada por muitos fatôres, como temperatura (9), nutrientes (1, 3, 4, 5, 10), etc.

A finalidade dêste trabalho é analisar a produção da toxina por vários fungos do gênero *Aspergillus*, isolados de diversas fontes naturais do Estado de São Paulo. Os melhores produtores de aflatoxina selecionados foram comparados com os isolados em laboratórios dos Estados Unidos (Texas e Peoria) e da Inglaterra.

MATERIAIS E MÉTODOS

As linhagens de *Aspergillus* foram isoladas de amendoim procedente de diferentes regiões do Estado de São Paulo, de café e de torta de amendoim, sendo êstes de procedência desconhecida, sabendo-se apenas que a torta era rica em aflatoxina (teor muito alto) e o café estava armazenado no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Utilizou-se, também, fungos contaminantes de placa no laboratório. No total, foram comparadas 41 linhagens de fungo do gênero *Aspergillus*.

Os fungos foram isolados, semeando-se em placas contendo meio sólido de malte-batata (MB). A identificação do fungo foi feita com base nos aspectos macroscópico (côr e aspecto) e microscópico (condióforo e hifas).

Foram usados os meios malte-batata (MB) e Czapeck ágar modificado (10% de sacarose) para manutenção da cultura isolada e o meio YES (2% de extrato de levedura e 20% de sacarose) (3), para produção de toxina.

Os fungos *Aspergillus flavus*, numerados I, II, III, V e VI, e *Aspergillus parasiticus*, correspondente ao número IV, foram obtidos em laboratório do TEXAS;

E.U.A.; *Aspergillus flavus* números VII, VIII e IX, de Peoria, E.U.A.; e *A. flavus* X e *A. parasiticus* XI, de um laboratório da Inglaterra. Os fungos *Aspergillus*, por nós isolados, foram numerados de 1 a 41.

Os fungos foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio. Os frascos foram inoculados com duas alçadas de cultura em ágar inclinado de 1 a 3 semanas de idade e incubados a 26°C, em cultura estacionária durante 6 a 9 dias.

A extração e a determinação preliminar da toxina foram feitas pelo método-padrão de Coomes-Feuell (2), com as seguintes modificações: adicionando-se 30 ml de metanol ao frasco contendo 50 ml de meio com o fungo desenvolvido e aquecendo-o em ebulição por 1,5 a 2 horas, sob refluxo, extraindo-se a toxina com cinco lavagens de 25 a 30 ml de clorofórmio. Concentrando-se o extrato clorofórmico a 20 ml (solução A) e pela diluição de 5 vêzes desta, obteve-se a solução B (2 ml foram diluídos a 10 ml). Aplicaram-se na placa de cromatografia em camada delgada: 8 µl da solução A (a), 8 µl (b_1), e 2 µl (b_2) da solução B. Usou-se o eluente acetato de etila-metanol, na proporção 3:1(12).

A determinação quantitativa mais exata da aflatoxina foi feita pelo método da extinção e as diluições por tentativas. Nessa determinação, o método do autor acima citado foi modificado mais ainda, iniciando-se com a separação do micélio (M) e do líquido sobrenadante (S). Extraiu-se a toxina do micélio (M), adicionando-se 30 ml de metanol e 20 ml de água, aquecendo-se em ebulição por 1,5 a 2 horas sob refluxo. Em seguida, lavou-se o micélio com 20 ml de água e extraiu-se a toxina da solução com cinco tratamentos com 20 ml de clorofórmio. Concentrou-se o extrato clorofórmico a 50 ml (solução A); diluiu-se 0,75 ml desta solução a 50 ml (solução B) e 5 ml da solução B a 10 ml (solução C). Extraiu-se a toxina do líquido sobrenadante (S), mediante a adição de 30 ml de metanol e aquecendo-se à ebulição por 1,5 a 2 horas sob refluxo. Após a lavagem do frasco com mais ou menos 25 ml de

água, extraiu-se a toxina com cinco tratamentos de 25 ml de clorofórmio em funil de separação.

Concentrou-se o extrato clorofórmico a 50 ml (solução A); diluiu-se 1 ml desta a 50 ml (solução B) e 5 ml da solução B a 10 ml (solução C). Aplicou-se a solução C em placas de cromatografia, em camada delgada, nas seguintes quantidades: 2,5, 5,0, 7,5 10,0, 12,5 µl usando-se o eluente com 5% de metanol em clorofórmio.

Apesar de virificar-se uma pequena redução da fluorescência no eluente acetato de etila-metanol, êle foi usado na determinação preliminar da toxina, pois existem certas substâncias fluorescentes, além da aflatoxina, com mesmo Rf em eluente clorofórmio-metanol (12). Porém, usou-se êste último na determinação quantitativa, pois para êste eluente, a quantidade mínima de aflatoxina com fluorescência observável é 0,0004 µg (2).

Calculou-se a quantidade de aflatoxina, em miligramas, utilizando-se da seguinte fórmula:

$$A = \frac{4 \times 10^{-4} \times V}{V'}$$

em que:

A = quantidade de aflatoxina em miligramas.

V = quociente entre o produto dos volumes totais (em ml) de cada diluição e o produto dos volumes (em ml) transferidos para ser diluídos. Para o caso de extrato clorofórmico do líquido sobrenadante: V = produto do volume total das soluções A, B, C (50, 50 e 10 ml) dividido pelo produto dos volumes transferidos da solução A e B (1 e 5 ml).

V' = menor volume em que se observa a fluorescência. Fêz-se a escolha das condições de cultivo, bem como do método de extração, identificação e dosagem da aflatoxina, observando-se as possibilidades do laboratório, as facilidades na execução e, principalmente, a possível qualidade e quantidade de aflatoxina a produzir.

RESULTADOS

Os resultados das determinações preliminares de aflatoxina produzida por diversas linhagens de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* recebidos dos laboratórios dos Estados Unidos e da Inglaterra estão apresentados no Quadro 1. Para expressar as diferentes quantidades de aflatoxina, adotou-se valôres numéricos de 0 a 10. Nessa escala arbitrária, o valor 0 corresponde aos pontos sem a fluorescência e 10 à intensidade máxima observada na determinação. Valôres intermediários (1 a 9) correspondem às intensidades crescentes de fluorescência. Quando 8 µl da solução A (a) apresentavam uma fluorescência correspondente ao valor 1, a solução B, 8 µl (b_1) e 2 µl (b_2) mostrava resultados negativos; acontecendo o mesmo quando a da solução A (a) era pouco mais intensa (valôres numéricos de 2 a 3). Poder-se-ia notar, fàcilmente, que b_1 apresentava o valor 1, 2, 3, 4 e b_2 igual a 0, quando a intensidade da fluorescência em a era, respectivamente, 4, 5, 6, 7. Já, quando b_2 mostrava uma fluorescência mínima, igual a 1, notava-se que b_1 era de 5 e a tinha um valor 8 na escala. Esta escala não é exatamente reproduzível, pois não se conhece o valor quantitativo absoluto de nenhuma das intensidades. Assim, ela é útil sòmente numa comparação, quando se tem dez pontos fluorescentes de intensidades crescentes. No presente caso, foi adotada simplesmente para facilitar a escolha dos melhores produtores de aflatoxina.

Todos êstes fungos produziram quantidades apreciáveis de toxina B e G, exceto o *A. flavus* 134-50-14-1-8*a* do laboratório do Texas E.U.A., que só produziu a toxina B. O que produziu mais aflatoxina B foi o *A. flavus* 198-26*c* dêsse mesmo laboratório.

Quadro 1. Produção de aflatoxina pelas linhagens de *Aspergillus* recebidas de diversos laboratórios, medida na escala arbitrária de 0 a 10, onde 0 corresponde ao ponto de fluorescência negativa e 10 à intensidade máxima. Os valôres intermediários representam intensidades crescentes de fluorescência. Médias de duas determinações, exceto as indicadas (*), onde foi feita apenas uma.

Linhagens		Aflatoxina B			Aflatoxina G			
Número dado	Número de origem	*a*	b_1	b_2	*a*	b_1	b_2	
I	134-50-14-1-8*a*	7	4	0	0	0	0	
II	134-23-6-13-19*c*	6	3	0	6	3	0	
III	24-1-1-*a*	6	3	0	5	2	0	
IV	10-4-*db*	4	1	0	5	2	0	
V	198-26*c*	9	6	2	6	3	0	
VI	199-7*a*	4	1	0	5	2	0	
VII	NRRL 2999	5	2	0	7	4	0	
VIII	NRRL 3000	4	1	0	6	3	0	
IX	NRRL 3240	4	1	0	6	3	0	
X	3734/10	4	1	0	6	3	0	(*)
XI	CMI 15957	4	1	0	6	3	0	(*)

a: resultado correspondente a 8µl da solução A.

b_1: resultado correspondente a 8 µl da solução B.

b_2: resultado correspondante a 2 µl da solução B.

As linhagens de *Aspergillus* isolados de diversas fontes naturais do Estado de São Paulo, produziram quantidades variáveis da toxina (Quadro 2). Usou-se a mesma escala, acima citada, para expressar as diferentes quantidades de aflatoxina. A maioria dêstes fungos sintetizou sòmente aflatoxina B e alguns perderam a vitalidade ao ser repicados. As linhagens mais produtivas apresentaram uma quantidade de toxina ligeiramente superior às linhagens importadas.

Quadro 2. Produção de aflatoxina pelasllinhagens de *Aspergillus* isoladas das diversas fontes naturais do Estado de São Paulo, medida na escala arbitrária de 0 a 10, onde 0 corresponde ao ponto de fluorescência negativa e 10 à intensidade máxima. Os valôres intermediários representam as intensidades crescentes de fluorescência. Média de duas determinaçôes, exceto as indicadas (*), onde foi feita apenas uma.

Linhagens	Aflatoxina B			Aflatoxina G			Linhagens	Aflatoxina B			Aflatoxina G		
	a	b_1	b_2	a	b_1	b_2		a	b_1	b_2	a	b_1	b_2
1	8	5	1	0	0	0	22	3	0	0	0	0	0
2	4	1	0	2	0	0	23	7	4	0	0	0	0
3 (*)	-	-	-	-	-	-	24	1	0	0	0	0	0
4	4	1	0	3	0	0	25	6	3	0	0	0	0
5 (*)	-	-	-	-	-	-	26	4	1	0	6	3	0
6	7	4	0	0	0	0	27	7	4	0	0	0	0
7	6	3	0	0	0	0	28	6	3	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0	0	29	8	5	1	0	0	0
9	10	7	3	0	0	0	30(*)	-	-	-	-	-	-
10	8	5	1	0	0	0	31	10	7	3	0	0	0
11	1	0	0	0	0	0	32	8	5	1	0	0	0
12	1	0	0	0	0	0	33	4	1	0	0	0	0
13 (*)	-	-	-	-	-	-	34	8	5	1	0	0	0
14	8	5	1	0	0	0	35	7	4	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	36	8	5	1	0	0	0
16 (*)	-	-	-	-	-	-	37	6	3	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	38	3	0	0	0	0	0
18	2	0	0	0	0	0	39	4	1	0	6	3	0
19	10	7	3	0	0	0	40	5	2	0	0	0	0
20	2	0	0	0	0	0	41(*)	8	5	1	0	0	0
21	7	4	0	0	0	0							

- : não desenvolveu

a : resultado correspondente a 8 μl da solução A.

b_1 : resultado correspondente a 8 μl da solução B.

b_2 : resultado correspondente a 2 μl da solução B.

A classificação das diversas linhagens de *Aspergillus*, quanto à produção de aflatoxina, está apresentada no Quadro 3. Os resultados mostram que a maioria dos fungos isolados de diferentes fontes naturais do Estado de São Paulo é "Médio produtor" de aflatoxina B e "Mau produtor" de aflatoxina G, enquanto que os recebidos dos laboratórios dos Estados Unidos e da Inglaterra são "Médios produtores das toxinas B e G.

Fêz-se a classificação dos fungos em bom, médio e mau produtor de aflatoxina, baseando-se nos resultados observados segundo à fluorescência nos pontos onde foram aplicados 8 µl da solução A (a), 8 µl da solução B (b_1) e 2 µl da solução B (b_2).

Os limites adotados para essa classificação foram os seguintes:

a	b_1	b_2	Classificação
8 a 10	5 a 7	1 a 3	= Bom produtor
4 a 7	1 a 4	0	= Médio produtor
0 a 3	0	0	= Mau produtor

Os números de 0 a 10 são os valôres arbitrários, já citados anteriormente.

Quadro 3. Classificação das linhagens de *Aspergillus* quanto à produção de aflatoxina. Resultados expressos em porcentagem de linhagens. Os fungos produziram aflatoxina, cujo valor na escala arbitrária em *a* é de 8-10 ou 1-3 em b_2, foram considerados "Bons produtores" e quando o valor numérico em *a* é de 4-7 ou 1-4 em *b*1,"Médio produtor". Os demais foram considerados "Maus produtores".

Classificação	Aflatoxina B	Aflatoxina G
(Linhagens recebidas)		
bom produtor	9,09	0,0
médio produtor	90,90	90,90
mau produtor	0,0	9,09
(Linhagens das fontes naturais)		
bom produtor	24,39	0,0
médio produtor	41,46	4,87
mau produtor	34,15	95,12

Os resultados das determinações quantitativas de aflatoxina B, produzidas pelas linhagens mais eficientes, foram expressos em miligramas da toxina por frasco de 50 ml de meio (Quadro 4). O número 9, isolado no laboratório do ITAL, foi o melhor produtor de aflatoxina B (2,553 mg de toxina por 50 ml de meio) seguindo-se o de *A. flavus* 198-26c do laboratório do Texas, E.U.A. A proporção da toxina presente no micélio em relação à do líquido sobrenadante foi variável, sendo para uns igual, para outros maior ou, ainda, menor.

Quadro 4. Determinação quantitativa de aflatoxina B, no micélio e no líquido sobrenadante, produzida pelas linhagens mais eficientes. Média de duas determinações.

Linhagens número	Aflatoxina B em mg/50 ml		
	Micélio	Sobrenadante	Total
I	0,547	0,900	1,447
V	0,700	1,435	2,135
9	1,453	1,100	2,553
10	0,455	0,366	0,821
19	0,633	1,100	1,733
21	0,633	0,600	1,233
25	0,547	0,600	1,147
29	0,517	0,600	1,117
31	0,987	0,765	1,752
32	0,467	0,400	0,867
34	0,367	0,435	0,802
35	0,547	0,500	1,047
36	1,180	0,604	1,784
41 (1)	1,230	0,333	1,563
41 (2)	0,900	0,250	1,150
41 (3)	0,900	0,250	1,150

(1) Cultura 41 mantida em Czapeck ágar inclinado.
(2) Cultura 41 mantida em MB e repicada 2 semanas antes de ser inoculada em Czapeck ágar inclinado.
(3) Cultura mantida em MB.

DISCUSSÃO

À primeira vista, examinando-se os resultados, tem-se a impressão de que os fungos recebidos dos laboratórios dos Estados Unidos e da Inglaterra são os melhores produtores de aflatoxina. No entanto, isto não é real, pois êstes já tinham sido selecionados,

enquanto que os isolados em Campinas (ITAL) estão passando pela "fase de seleção". Assim considerando, nota-se que muitos dos fungos isolados porduzem quantidades razoáveis de aflatoxina B. E é de nosso interesse selecionar fungos produtores de grande quantidade de toxina B, pois é a mais tóxica e geralmente produzida em maior quantidade. É, também, muito interessante observar que poucos fungos isolados neste laboratório sintetizam a aflatoxina G.

Os resultados quantitativos do Quadro 4 mostram certas discrepâncias quando comparados com os dos Quadros 1 e 2. Isso pode ser atribuído à comparação inicial grosseira, e principalmente porque nem sempre o fungo se comporta da mesma maneira, apesar de lhe ser dado idênticas condições. Notou-se, às vêzes, que o fungo deixa de se desenvolver ou de produzir conídios com a mesma rapidez e intensidade; estacionando-se, outras vêzes, sem produzi-los e permanecendo esbranquiçado, com aspecto de degeneração, como, por exemplo, o *A. parasiticus* 10-4-db do laboratório do Texas, E.U.A., que em tôdas determinações permaneceu assim, formando um composto de agradável aroma.

Parece-nos que, para uma eficiente produção de aflatoxina, seja necessário um bom desenvolvimento do fungo com produção de conídios. O meio de cultura, no qual o agente produtor é isolado, também exerce grande influência, pois notou-se uma redução da toxina nos fungos mantidos em meio de malte-batata.

Os mais variados valôres de aflatoxina produzida são encontrados na literatura, sendo o máximo de 63 mg por 100 ml de meio (3). Porém, é difícil afirmar qual é o melhor meio, pois uns são sólidos e outros líquidos, além de serem usadas diferentes condições de cultivo. Como no Brasil foi encontrado amendoim com até 290 p.p.m. da toxina, era de se esperar os mais altos valôres de aflatoxina produzida, porém êstes foram inferiores aos obtidos por Davis e colaboradores (3).

Alguns pesquisadores admitem que fungos isolados e repicados várias vêzes perdem a habilidade de sintetizar aflatoxina (9); isso pode ter ocorrido no presente caso. Talvez êsse inconveniente possa ser eliminado pela inoculação temporária do fungo num produto alimentício apropriado.

LITERATURA

1. CODNER, R.C., SARGEANT, K. & YEO, R. Production of aflatoxina by the culture of Strains of *Aspergillus flavus - oryzae* on sterilized peanuts. Biotechnol. Bioeng 5: 185-192, 1963.

2. COOMES, T.J. & FEUELL, A.J. Recommended procedures for the detection and estimation of aflatoxin B, in groundnuts and groundnut materials. London Trop. Products Inst. 1968, 24 p. mimeogr. (Report nº G 13).

3. DAVIS, N.D., DIENER, U. L. & ELDRIDGE, D. W. Production of aflatoxins B_1 and G_1 by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. Appl. Microbiol, 14: 378,380, 1966.

4. DIENER, U.L. & DAVIS, N.D. Agr. Expt. Stn. Auburn Univ., Auburn, Alabama, 1966.

5. _____ & _____. Phitopathol. 56, 1390, 1966.

6. FONSECA, H. Levantamento do teor de aflatoxina em tortas e farelos de amendoim (*Arachis hipogaea*, L) no Estado de São Paulo, Tese de Doutoramento ESALQ-USP, Piracicaba, 1968.

7. MATELES, R.I. & WOGAN, G.N. *In* "Aflatoxins", A. H. Rose J.F. Wilkinson (Ed) p. 25, Academic Press. N.Y., 1967.

8. SARGEANT, T., SHERIDAN, A., O'KELY, J. e CARNAGHAN, R.B.A, Nature 192, 1096, 1961.

9. SCHROEDER, H.W. & HEIN JR., H. Aflatoxins: production of the toxin in vitro in relation to temperature. Appl. Microbiol. 15: 441-445,1967.

10. SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W., STUBBLEFIELD, R. D. & SORENSON, W.C. Production of aflatoxin on Rice. Appl. Microbiol. 14: 425-428, 1966.

11. TEIXEIRA, C.G., MENEZES, T.J.B., TANGO, J. S. e COELHO, F.A.S. Ocorrência do *Aspergillus flavus* e da aflatoxina em sementes e farelo de amendoim. Ciência e Cultura 18 (2): 128-129, 1966.

12. YOKOTSUKA, T., SASAKI, M., KIKUCHI, T., ASAO, Y e NOBUHARA, A. *In* "Biochemistry of some Foodborne Microbial Toxins", R.I. Mateles e G.N. Wogan (Ed). The MIT Press, Cambridge, Mass, 1967.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/1970

PROCESSAMENTO DA FARINHA DE MILHO PRÉ-GELATINIZADA, SEU EMPRÊGO E RESULTADOS NA PANIFICAÇÃO

Werner Horst Bär

RESUMO

Quando a farinha de milho é submetida a um tratamento térmico conveniente, o pão resultante da mistura de 20% dessa farinha com a de trigo, apresenta um sabor agradável e o seu volume é pràticamente igual ao do pão de farinha de trigo pura.

A massa, quando manipulada manual ou mecânicamente, não apresenta caráter pegajoso.

Verificou-se, através de análises físico-químicas, que o tratamento térmico ocasiona determinado grau de gelatinização do amido, o qual depende da intensidade desse tratamento.

O tratamento térmico aplicado à farinha de milho é brando quando ela se destina à panificação. Para isso, é inicialmente regulada na umidade entre 22 a 25% antes de receber o tratamento térmico, após o que, mediante injeção de vapor, a temperatura atinge cêrca de 95ºC e a umidade final chega ao redor de 35 a 40%.

Observou-se que o volume do pão misto diminui à medida que a intensidade do tratamento térmico conferido à farinha de milho aumenta.

O contrôle do grau de pré-gelatinização está de certo modo relacionado com o aumento do poder de absorção de água acusado pela farinha mista no farinógrafo, bem como pelo do poder de retenção da farinha de milho verificado na centrífuga.

SUMMARY

PROCESSING AND UTILIZATION OF PRE-GELATINIZED CORN FLOUR FOR BREAD MAKING. *When the corn flour is submitted to a convenient thermal treatment, the composite bread resulting from the mixture of 20% corn flour with wheat flour has a good taste and the volume is pratically equal to the one pure wheat. The dough, when manually or mechanically hardled, is not sticky.*

It was observed through the physical and chemical analyses that the thermal treatment causes a certain grade of gelatinization of the starch that depending of the intensity of the thermal treatment.

The thermal treatment given to the flour is light, and it does not become sticky after processing, being next dried in driers. The flour humidity is initially regulated for a moisture content of 22 to 25% suffering next a thermal treatment with steam injection. The temperature goes up to nearly 95ºC during this treatment and the humidity content passes to 35 up 40%.

It was observed that the more intense is the pre-gelatinization grade the smaller is the bread volume.

The control of pre-gelatinization grade has been made by determining the water absorption power in the farinograph, and by the method of centrifugation.

INTRODUÇÃO

O emprêgo do milho na panificação tem a particularidade de manter o valor nutritivo dos pães mistos, quando elaborados de farinha de trigo contendo 20% de farinha de milho. Entretanto, para que êsse tipo de pão seja de qualidade, há necessidade de se submeter prèviamente a farinha de milho a um tratamento

térmico. Êsse tratamento confere-lhe condições especiais, que permitem dar um pão de bom paladar, reduzindo aquele sabor característico da farinha de milho. Por outro lado, não há modificação na manipulação da massa pelo padeiro, o que não aconteceria se a farinha de milho não fôsse submetida ao referido tratamento. Ter-se-ia, neste caso, uma massa pegajosa, que dificultaria ostrabalhos de moldagem, quer fossema mão ou mecanizados.

Comparando-se êsse tipo de pão ao de trigo, verifica-se que as diferenças são mínimas quanto ao volume e à textura do miolo. Para serem alcançados os resultados desejados, entram na receita do pão de milho determinados aditivos, em número de dois, pelo menos, para que seja mantido o equilíbrio da capacidade de produção, na massa e, conseqüentemente, para se assegurar ao pão, volume e textura em condições iguais àquelas de trigo puro.

TRABALHO EXPERIMENTAL

Os trabalhos, em relação ao milho, foram conduzidos procurando-se efetuar tratamentos térmicos de intensidades variáveis, bem como verificar, em seguida, seus resultados na panificação. Procedeu-se ao tratamento térmico brando, de modo a que o produto, na fase final, adquirisse a umidade máxima de 39%, e ao tratamento rigoroso, para obter-se umidade final ao redor de 70%.

Com referência ao tratamento brando, a farinha de milho não adquire o estado pastoso após o respectivo processamento, como acontece nos tratamentos térmicos mais rigorosos após o respectivo processamento.

Dentro das disponibilidades de equipamento, o processo térmico foi efetuado em aparelho denominado "Thermascrew", de procedência estadunidense. É um aparelho cilíndrico, fechado, munido de uma rosca sem

fim e que permite o percurso da farinha de milho de uma extremidade a outra. Durante o trajeto, o vapor injetado fornece à farinha calor e água resultantes da condensação, provocando um aumento gradual de temperatura e de umidade, conforme a velocidade imprimida à rosca.

O tratamento térmico brando é feito de modo que a farinha de milho obtida possua uma porcentagem de umidade inicial entre 22 a 25%, mediante adição de água, que é ajustada de acôrdo com a seguinte fórmula:

$$b = \frac{a\ (H_2 - H_1)}{100 - H_2}$$

sendo b a quantidade de água a ser acrescentada em a gramas de farinha de umidade inicial H_1, para se ter a umidade final H_2. Logo a seguir, a farinha passa pelo referido tratamento, com tempo de percurso de 2,5 minutos, deixando o aparelho à temperatura de 95 a 99ºC e com uma umidade variável entre 35 a 39%. Nessas condições, permanece em descanso durante 10 minutos, sendo logo em seguida efetuada a secagem à temperatura de 60ºC, em secadores de ar forçado. O produto, uma vez sêco, sofre uma moagem para desfazer os flocos maiores, de maneira a obter-se um grau de finura adequado para o fim a que se destina.

Com referência ao tratamento térmico rigoroso, a umidade inicial da farinha deverá ser de tal ordem que, ao final do processo, apresente estado pastoso e temperatura aproximada de 100ºC.

No decorrer dos trabalhos, verificou-se que os melhores resultados na elaboração de pães mistos, foram obtidos com farinha de milho que sofreu tratamento brando, conforme foi descrito acima.

Durante o processamento, o componente principal da farinha de milho, que é o amido, sofre o

fenômeno da gelatinização, e a farinha posteriormente observada no microscópio, mostra seus grãos de amido com ruptura parcial ou total, conforme a intensidade do tratamento térmico.

A farinha mista, resultante da mistura da farinha de trigo com a farinha de milho prèviamente tratada, acusa um poder de absorção de água, no farinógrafo, maior do que a farinha de milho comum na mesma porcentagem de mistura. Tem-se verificado, no farinógrafo, o aumento progressivo do poder de absorção com a intensidade de tratamento térmico.

O farinógrafo é um aparelho de laboratório que tem a propriedade de determinar o poder de absorção da farinha mediante acréscimo controlado de água, formando uma massa cuja consistência registrada nesse aparelho é de 500 unidades farinográficas.

Conseguiu-se um método mais simples e rápido de relacionar a absorção de água com a intensidade do tratamento térmico, ou seja, mediante a simples centrifugação de uma suspensão dessa farinha em água. Por êsse sistema, é possível calcular-se a porcentagem de retenção por diferença de pêso antes e após a passagem na centrífuga. A centrífuga utilizada é da marca Fanem, que vem munida de quatro tubos, com diâmetro interno de 45 mm e comprimento de 110 mm. A distância do eixo da centrífuga ao fundo do tubo, quando êste permanece em posição horizontal, durante o movimento, é de 190 mm.

Os ensaios de panificação foram feitos tomando-se receita semelhante à receita-padrão para elaboração do pão francês. A porcentagem dos ingredientes indicados na receita, refere-se à quantidade calculada sôbre 100% do pêso da farinha mista, resultante da mistura de 80% de farinha de trigo e 20% de farinha de milho. Entretanto, essa receita deverá incluir a suplementação de aditivos, geralmente em número de dois, em caso de necessidade, a fim de melhorar o equilíbrio de produção e de retenção de gás carbônico, que se forma durante a fermentação.

A porcentagem de água indicada na receita, estará na dependência de ensaio prévio, podendo ser constante sua adição nas diferentes farinhas mistas, ou então variar, de acôrdo com o poder de absorção de água registrado no farinógrafo para cada amostra.

No decorrer dos ensaios, verificou-se que a adição de leite desnatado em pó, na proporção de 2%, melhora a porosidade do miolo e o paladar do pão, além de elevar o seu valor nutritivo. A farinha de soja desengordurada, adicionada na mesma porcentagem, poderá substituir o leite no que diz respeito ao valor nutritivo. O leite de soja em pó atua de modo semelhante ao do leite desnatado em pó.

A receita básica é preparada com 500 g de farinha abrangendo os seguintes ingredientes, em porcentagem sôbre o pêso da farinha:

Farinha mista	100
Água (variável)	60
Fermento biológico	3
Sal	2
Açúcar	2
Gordura	2
Leite desnatado em pó	2
Produto enzímico (variável)....	0,006
Aditivo químico (variável).....	0,001

Adotou-se o método direto de fermentação, no qual os ingredientes são incorporados à farinha para formar a massa, como comumente é feito nas padarias. A fermentação processa-se em duas fases de 30 minutos de duração cada uma, e a temperatura inicial da massa é de 26°C. Terminada a primeira fase, sova-se a massa para expelir os gases formados e incorpora-se quantidade suficiente de oxigênio, para ser executada a segunda. Logo a seguir, efetua-se a moldagem, dividindo-se a massa em duas porções em formato de bola, que são colocadas na fôrma correspondente. Nesta, a massa moldada entra na fase de crescimento em ambiente de 32°C de temperatura e umidade relativa de 80 a 85%.

Sabe-se que a massa está crescida quando, ao ser tocada com o dedo, o ponto pressionado não volta à posição inicial. O tempo de crescimento varia de acôrdo com a qualidade da farinha de trigo. A duração é de 60 minutos. Logo a seguir, é efetuado o crescimento da massa no forno à temperatura de 220ºC, durante 30 minutos. Após 18 horas de permanência do pão em ambiente adequado, determinam-se o seu volume em centímetros cúbicos e a porosidade interna do miolo. Os valores 7, 6, 5 e 4, correspondem, respectivamente, à porosidade ótima, boa, regular e deficiente. A elasticidade do miolo é normal, se a porção pressionada com o dedo, voltar novamente à posição inicial, sem prejudicar a estrutura do miolo no ponto tocado.

Os aditivos comumente utilizados são o ácido ascórbico e o mono-estearato de glicerina, que atuam na farinha no sentido de proporcionar uma melhor retenção dos gases na fermentação e no cozimento da massa. Como produto diastásico, à base de ênzimos amilolíticos, tem-se utilizado diversos produtos encontrados no comércio, dentre os quais se destaca aquêle denominado pantase, que é obtido mediante a extração de ênzimos produzidos pelo fungo *Aspergillus oryzae*. No Instituto de Tecnologia de Alimentos, tem-se preparado êsse ênzimo com resultados eficientes na panificação, para o equilíbrio da capacidade de produção de gás carbônico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaios no farinógrafo

Por meio do farinógrafo, verificou-se a possibilidade de diferenciar as diversas farinhas mistas mediante o poder de absorção de água, que aumenta em escala progressiva, de acôrdo com a intensidade do tratamento térmico aplicado na farinha de milho adicionada na proporção de 20% à farinha de trigo. Conforme

o Quadro 1, foram relacionadas diversas farinhas de acôrdo com o poder de absorção, em ordem crescente dos valores registrados no farinógrafo, quando adicionadas cada uma, na proporção de 20% em relação à farinha de trigo, a qual acusou um poder de absorção de 61%.

Quadro 1. Poder de absorção em água de diversas marcas de farinha de milho, quando adicionadas à farinha de trigo na porporção de 20%.

Amostras	Poder de absorção em água no farinógrafo (ml/100/g de farinha mista)
	%
1. Farinha de milho, variedade Opaco-2, sem tratamento	58,0
2. Farinha de milho Minasa, sem tratamento	58,2
3. Farinha de milho parcialmente pré-gelatinizada, conforme processamento no ITAL	59,6
4. Farinha de milho denominada Quaker-1, prégelatinizada	59,6
5. Farinha de milho Quaker-1, Pré-gelatinizada	60,0
6. Farinha de milho Ligador M-2	60,8
7. Farinha de trigo, sem adição de outra farinha	61,0
8. Amido de milho, denominado de pão-gel, pré-gelatinizado	61,8
9. Farinha de milho P.C.M. pré-gelatinizada	68,0
10. Farinha de milho Piratininga pré-gelatinizada	68,6
11- Farinha de milho Quaker-2, pé-gelatinizada	69,0
12. Farinha de milho Quaker-4, pré-gelatinizada	70,2
13. Farinha de milho altamente pré-gelatinizada	73,2
14. Farinha de milho Mogul, pré-gelatinizada	74,0

A amostra 1 de farinha de milho, variedade Opaco-2, adicionada na proporção de 20% à farinha de trigo acusou, no farinógrafo, um poder de absorção de 58%. A amostra 3, referente à farinha de milho parcialmente pré-gelatinizada, segundo processamento que originou uma umidade final de 35%, quando misturada à farinha de trigo na mesma proporção, resultou em um poder de absorção de 59,6%, que é, portanto, maior do que aquêle apresentado pela amostra 1, quando adicionada à mesma farinha de trigo. O poder de absorção das amostras seguintes aumentou progressivamente com a intensidade do tratamento térmico. As amostras correspondentes a um poder de absorção de 68% ou mais, correspondem ao tratamento térmico rigoroso, conferindo uma pré-gelatinização elevada ao amido na farinha.

A seguir, misturou-se, em porcentagens diversas, uma farinha de milho fracamente pré-gelatinizada com outra altamente pré-gelatinizada. As amostras resultantes foram empregadas em mistura com farinha de trigo, na porcentagem de 20%. Os resultados obtidos foram os seguintes:

1. A mistura de 80% de farinha de trigo com 20% de farinha de milho parcialmente pré-gelatinizada, acusou no farinógrafo um poder de absorção de 62%.

2. A mistura de 80% de farinha de trigo com 20% de farinha de milho altamente pré-gelatinizada, acusou no mesmo aparelho um poder de absorção de 74,2%.

Pelos dados do Quadro 2, verifica-se o aumento progressivo no poder de absorção de água com a adição em ordem crescente de farinha de milho altamente pré-gelatinizada.

Pela mistura de duas farinhas de milho de graus extremos de pré-gelatinização, pode-se obter farinhas que apresentam valores de absorção compreendidos entre os dois extremos considerados.

Quadro 2. Aumento do poder de absorção da farinha mista segundo a adição crescente de farinha de milho altamente pré-gelatinizada.

Farinha de milho parcialmente pré-gelatinizada	Farinha de milho altamente pré-gelatinizada	Poder de absorção no farinógrafo (ml/100 g da farinha mista
%	%	%
100	0	62
90	10	63,6
80	20	64,4
60	40	67,0
40	60	69,8
0	100	74,2

Ensaio de panificação

Para fins de panificação, procedeu-se à mistura porcentual de duas amostras de farinha de milho nas mesmas condições assinaladas anteriormente. Uma farinha parcialmente pré-gelatinizada, apresentava poder de absorção de 59,6% e, outra, de pré-gelatinização total, um poder de absorção de 73,2%. Cada amostra de farinha de milho resultante da mistura porcentual foi adicionada à farinha de trigo de poder de absorção de 58%, na proporção de 20%. De cada farinha mista resultante, procedeu-se a um ensaio de panificação, cujos resultados são apresentados no Quadro 3.

Verificou-se, nesse ensaio, o decréscimo de volume do pão e o seu aumento em pêso, quando foi obedecida a ordem crescente de acréscimo da farinha totalmente pré-gelatinizada com farinha parcialmente pré-gelatinizada. Os ensaios foram levados a efeito considerando-se na receita a adição de 58% de água para todas as amostras. A farinha mista que apresenta valores mais próximos daqueles da farinha de trigo pura, corresponde à farinha de milho parcialmente pré-gelatinizada adicionada na proporção de 20%,

obtendo-se um poder de absorção de água de 59,6%, conforme foi demonstrado no quadro anterior. À medida que se aumenta o grau de pré-gelatinização, os pães resultantes diminuem em volume e aumentam em pêso.

Quadro 3. Análise dos pães elaborados.

Pães	Pêso do pão	Volume do pão	Porosidade
	g	cc	
1) Trigo puro	352	1260	6
Farinha mista com 20% de farinha de milho pré-gelatinizada.			
2) 100% de pré-gelatinização parcial	360	1220	6
3) 90% de parcial + 10% de total	360	1160	6
4) 80% de parcial + 20% de total	361	1100	5-6
5) 60% de parcial + 40% de total	362	1090	5-6
6) 40% de parcial + 60% de total	367	960	5-6
7) 100% de total	372	880	6

Por intermédio da centrífuga, pode-se, de maneira simples e prática, caracterizar o estágio de pré-gelatinização da farinha de milho, ou seja, de acôrdo com a intensidade do tratamento térmico. Verificou-se que a retenção de água por determinada amostra, pelo processo de centrifugação, aumenta na razão da intensidade do tratamento térmico.

Preparou-se, com cada amostra, uma suspensão de 20 g de farinha de milho em 100 ml de água, isto é, cada par de tubos em posição oposta na centrífuga, re-

cebe 20 g da mesma farinha de milho e, o conjunto de tubo e a amostra são pesadas. Logo a seguir, faz-se a suspensão com 100 ml de água e submete-se o conjunto à centrifugação na razão de 2.000 rotações por minuto, durante 15 minutos. Decorrido o tempo citado, retira-se a água em excesso e pesa-se novamente. A diferença de peso, entre as duas pesagens, permite o cálculo da porcentagem de retenção de água. Ao mesmo tempo, tomam-se as mesmas amostras da farinha de milho, adiciona-se, cada uma delas, na proporção de 20% à farinha de trigo, e leva-se ao farinógrafo para obter o poder de absorção de água. Os resultados foram comparados com os valores de retenção de água na centrífuga, e constam do Quadro 4.

Quadro 4. Correspondência de valores entre a retenção de água e o poder de absorção de água no farinógrafo.

Amostras de farinha de milho pré-gelatinizada	Poder de absorção no farinógrafo (ml/100 g de farinha mista correspondente)	Retenção de água em g/100 g de amostra de farinha de milho
	%	%
1) Farinha de milho que não sofreu tratamento	58,2	106
2) Farinha de milho pré-gelatinizada Quaker - 1	59,0	109
3) Farinha de milho pré-gelatinizada Quaker - 3	60,0	119
4) Farinha de milho parcialmente pré-gelatinizada nos moldes feitos no CTPTA	59,6	121
5) Farinha de milho pré-gelatinizada Quaker - 2	69,0	196
6) Farinha de milho pré-gelatinizada Quaker - 4	70,2	211
7) Farinha de milho pré-gelatinizada Minasa	73,2	317
8) Farinha de milho pré-gelatinizada Mogul	74,0	485

Os resultados mostram ser perfeitamente viável tomar-se como medida do grau de pré-gelatinização a porcentagem de retenção de água, segundo o processo de centrifugação anteriormente descrito.

Tomaram-se as amostras Quaker, adicionando cada uma delas na porcentagem de 20% à farinha de trigo de 58% de poder de absorção de água. Procedeu-se, em seguida, ao ensaio de panificação nas condições idênticas às do primeiro ensaio. Na elaboração do pão, a quantidade de água adicionada às farinhas mistas foi igual àquela para farinha de trigo pura.

As amostras Quaker, dispostas em ordem crescente de porcentagem de retenção de água na centrífuga, apresentaram os seguintes resultados na elaboração do pão:

Quadro 5. Correspondência de valores entre o poder de retenção e absorção de água com resultados na panificação.

Amostras	Peso do pão	Volume	Porosidade	Retenção na centrífuga	Poder de absorção
	(em g)	(em cm^3)		%	(ml/100 g)
1) Pão de farinha de trigo pura	359	1120	6	-	58,0%
2) Pão correspondente à farinha Quaker-1	359	1120	5-6	109	59,0%
3) Pão correspondente à farinha Quaker-3	361	1080	6	119	60,0%
4) Idem, farinha Quaker-2	363	990	5-6	196	69,0%
5) Idem, farinha Quaker-4	365	820	5-6	211	70,2%

Pela adição de água à farinha mista, de acôrdo com o poder de absorção obtido no farinógrafo, verifica-se que os pães, de igual modo como no ensaio anterior, diminuem em volume e aumentam em pêso. Da mesma maneira, como no ensaio anterior, a farinha mista correspondente ao poder de absorção de água próximo ao da farinha de trigo pura, apresentou os melhores resultados em pêso e volume. Portanto, neste ensaio, verifica-se, também, que a farinha de milho parcialmente pré-gelatinizada oferece mais vantagens sôbre as demais, para obter-se um pão misto que seja de boa qualidade.

Na fase atual de andamento dos trabalhos, procedeu-se a uma série de ensaios, a fim de ser verificado o comportamento das farinhas mistas de milho em relação à capacidade de produção de gás carbônico. A determinação do índice de maltose permite uma medida do estado da farinha em relação ao seu poder de gaseificação, pois há uma relação entre a produção de gás e a atividade diastásica. O índice de maltose pode ser definido como sendo o teor de maltose calculado em uma determinada amostra de farinha, quando certa quantidade desta, em suspensão em água, permanece durante 60 minutos à temperatura de 27ºC sob a atividade dos ênzimos diastásicos.

A atividade diastásica é de suma importância, pois durante a fermentação da massa, os açúcares préexistentes são logo consumidos, sendo substituídos pela maltose que, desdobrada em glicose, torna a normalizar a produção de gases por ação do fermento biológico. Entretanto, a disponibilidade de maltose na massa, após o consumo dos açúcares preexistentes, depende da atividade diastásica. Assim, a farinha de trigo pura, quando acusar um índice de maltose menor que 1%, é deficiente quanto à capacidade de produção de gás, sendo possível sua correção mediante adição de produto diastásico como a pantose, já mencionada anteriormente. Ao contrário, um índice de maltose acima de 2,3%, exprime uma atividade diastásica mais elevada e o pão resultante tem a possibilidade de apresentar um miolo mole e pegajoso.

Com referência à farinha mista de milho, verificou-se um aumento do índice de maltose com o grau de pré-gelatinização da farinha de milho adicionada na porcentagem de 20% à farinha de trigo. Pode-se verificar, no Quadro 6, o aumento progressivo de valores em relação ao grau de pré-gelatinização crescente, de amostras de farinha de milho obtidas da mistura de duas amostras de graus extremos de pré-gelatinização.

Quadro 6. Relação entre a intensidade do tratamento térmico e o índice de maltose.

Amostras	Índice de maltose (g/100 g de farinha)	Poder de absorção no farinógrafo (ml/100 g) %
1) Farinha de trigo pura	1,49	61
2) 80% farinha de trigo mais 20% de farinha de milho parcialmente pré-gelatinizada	1,77	62
3) 80% farinha de trigo mais 20% de farinha de milho com pré-gelatinização	1,88	58
4) 80% de farinha de trigo, mais 20% da mistura, 90% parcial + 10% total	1,97	63,6
5) 80 % de farinha de trigo mais 20%da mistura de 80% parcial + 20% total	3,10	64,4
6) 80% farinha de trigo mais 20% da mistura de 60% parcial + 40% total	4,20	67,0
7) 80% farinha de trigo mais 20% da mistura de 40% parcial + 60% total	5,07	69,8
8) 80% farinha de trigo mais 20% de farinha de milho com pré-gelatinização total	5,83	74,2

A possível explicação poderá estar na maior dextrinização do amido, visto que a alfa-amílase, aumenta sua atividade à medida que se elevam a temperatura e a umidade da farinha de milho durante o processamento. Sabe-se que o tratamento térmico é tanto mais intenso quanto maior fôr a umidade da farinha de milho ao fim do processamento, já que a temperatura, na saída, é elevada e constante para todos os tratamentos. Como os ênzimos procedem da farinha de trigo na mistura com 20% de farinha de milho, o índice de maltose será tanto maior quanto maior fôr a dextrinização na farinha de milho, permitindo uma maior atividade da beta-amílase. Entretanto, esta fase de trabalho ainda não está terminada, necessitando-se verificar o fator responsável pela elevação do índice de maltose com o grau de pré-gelatinização.

CONCLUSÕES

Tendo em vista as diferenças de volume, pêso e porosidade nos pães obtidos de acôrdo com o grau de pré-gelatinização da farinha de milho, conclui-se que a intensidade do tratamento térmico deve ser controlada para obtenção do pão misto que tenha qualidades panificáveis próximas ou iguais às do pão de farinha de trigo pura, utilizada na mistura.

Tomando-se como ponto de referência o poder de absorção da farinha de trigo pura, que foi utilizada na mistura, o grau de pré-gelatinização da farinha de milho deverá ser de tal ordem que, a farinha mista correspondente proporcione um poder de absorção próximo ao da farinha de trigo.

Como tem-se em média, para uma farinha de trigo de qualidade, um poder de absorção de 60%, a farinha mista obtida deverá apresentar mais ou menos o mesmo valor. Se a farinha de milho pré-gelatinizada conferir um poder de absorção acima dêste, de 65% por

exemplo, os pães obtidos pelo método normal de fermentação, começam a perder volume e porosidade, acusando maior pêso.

Considerando-se a correspondência dos resultados entre a absorção de água registrada na centrífuga e no farinógrafo, e os resultados da panificação, pode-se como meio de caracterização da farinha de milho pré-gelatinizada, dizer que ela tem condições boas para elaboração de pães mistos. Quando os valores da porcentagem de retenção de água na centrífuga estiverem entre 110 a 150%, os pães são de volume e porosidade pràticamente iguais aos da farinha de trigo.

Os trabalhos orientados para obtenção da farinha de milho pelo tratamento térmico brando têm fundamento, visto que há maior viabilidade econômica. A razão principal reside em haver necessidade de se retirar mais água durante a secagem, quando o tratamento termído é intenso, o que não acontece com o tratamento brando. Além do mais, os secadores do tipo "flash" são ideais no processamento industrial para êsse tipo de secagem, quando o teor de umidade não seja elevado, como no caso de pré-gelatinização parcial.

Dentre os aditivos empregados, têm-se utilizado o ácido ascórbico e o monoestearato de glicerina. O ácido ascórbico foi adicionado na quantidade de 6 g por 50 kg de farinha de trigo.

Um aditivo que pode ser usado com sucesso na panificação é o monoestearato de glicerina, aquecendo-se uma parte dêste, com três partes de gordura hidrogenada e cinco partes de água em pêso. A emulsão obtida neste caso, é incluída na receita na quantidade de 2%.

O pão de milho está na dependência das qualidades panificáveis da farinha de trigo. Deve-se lançar mão de farinha que tenha pelo menos características médias de panificação. Uma farinha de trigo de

baixo poder de panificação, além de fornecer paes de baixa qualidade, não dará boa mistura com adição de farinha de milho. Portanto, é preciso levar em conta a qualidade da farinha de trigo, para se alcançar os resultados desejados. O pão de milho dificilmente ultrapassará, em qualidade, o pão duro obtido a partir da farinha de trigo empregada na mistura.

O pão de milho confeccionado segundo as normas citadas, pode diminuir sensìvelmente o sabor característico de milho. Além do mais, a manipulação da massa, pelo padeiro, é feita de modo idêntico à que faz com a massa de farinha de trigo pura. Isso não ocorre com a farinha de milho que não sofreu os efeitos da pré-gelatinização, cuja massa tem a tendência de grudar nas mãos, dificultando a sua manipulação.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/1970

RESISTÊNCIA TÉRMICA E CARACTERIZAÇÃO *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* POR ELECTROFORESE EM GEL DE SOBRENADANTES DE CULTURAS

Mauro Faber de Freitas Leitão

RESUMO

Sobrenadantes concentrados de linhagens de Vibrio parahaemolyticus *de origem gastroentérica, de "suspeitos"* V. parahaemolyticus *isolados de casos de infecção cutânea, de* Vibrio *marinho não patogênico,* V. anguillarum V. alginolyticus, *foram submetidos a electroforese plana em gel, seguida do exame dos géis de poliacrilamida para proteína total e modelos de ênzimos.*

Variações relacionadas à presença de formas simples e multimoleculares de ênzimos proteolíticos, lípases, estérases, fosfátases, amílases e desoxirribonucléases, permitiram a diferenciação entre as culturas em exame.

Uma semelhança estreita foi observada entre as culturas patogênicas isoladas de infecções cutâneas e as linhagens de V. parahaemolyticus *de origem gastroentérica. Êsse grupo foi bem diferenciado de* Vibrio *não patogênico,* V. anguillarum *e* V.alginolyticus, *mas, sob condições do experimento, êstes três últimos grupos não podiam ser fàcilmente diferenciados. Os testes envolvendo a detectação de DNase, amílase, lípase de gema de ôvo (principalmente relacionadas ao tempo e à intensidade da reação) pareceram ser os mais úteis para a caracterização do* V. parahaemolyticus, *e êsses resultados sugeriram que a aplicação da*

electroforese em gel de sobrenadantes de culturas, poderia ser de grande importância para rápida identificação dessa bactéria. Não se encontrou evidência indicando a presença do fator hemolítico, responsável pelo "fenômeno de "Kanagawa"!

Outro objetivo do presente estudo, foi a determinação da resistência térmica de V. parahaemolyticus, *utilizando-se a linhagem ATCC 17802 como organismo de teste. Foi empregado o método de frasco, com meio de cultura de água salgada e peptona, de pH 7,2.*

O tempo de redução decimal (valor D) foi o parâmetro empregado para expressar a resistencia térmica, observando-se os tempos de 38,2, 2,01 e 0,51 minutos, para as temperaturas de 113°, 118,4° e 112°F, respectivamente.

Um estudo para determinar a influência da composição do meio de recuperação na resistência aparente ao calor, demonstrou que contagens e taxas de sobrevivência mais elevadas foram observadas quando o meio de manutenção para Vibrio *era empregado para a contagem de células aquecidas, com uma diferença estatisticamente significativa (ao nível de 5%) sendo observada quando comparada com o "Brain Heart Infusion Agar" mais 2,5% de NaCl e "Trypticase Soy Agar" mais 2,5% de NaCl, sem diferença significativa entre os dois últimos meios de cultura.*

SUMMARY

THERMAL RESISTANCE AND CHARACTERIZATION OF *VIBRIO* **PARAHAEMOLYTICUS BY GEL ELECTROPHORESIS.** *Polyacrylamide gel electrophoresis of concentrated culture supernatants was carried out in order to characterize and differentiate* V. parahaemolyticus *from "suspected"* V. parahaemolyticus *cultures isolated from cases of skin infection,* V. anguillarum, *nonpathogenic marine* Vibrio *and* V. alginolyticus. *The differentiation was*

based on total protein patterns and examination of the gels for the presence of extracellular enzymes.

The results showed the presence of single and multimolecular forms of proteolytic enzymes, lipases, esterase, phosphatases, amylases and DNase, all supernatants showing the absence of the hemolytic factor responsible for the "Kanagawa phenomenon". A great similarity was observed between V. parahaemolyticus and the pathogenic cultures (strains CDC), independent of place and conditions of isolation. This group was clearly differentiated from the non-pathogenic Vibrio and from V. anguillarum and V.alginolyticus, that showed a uniform pattern in most reactions.

The tests involving the presence of DNase, amylase, egg yolk lipase (mainly related with time and intensity of reaction) appeared to be of value in the characterization of V. parahaemolyticus. The other tests, even showing some differentiation between strains and especies, did not seem to provide a good characterization. The results suggested that the use of gel electrophoresis of concentrated culture supernatants may supply evidences of possible taxonomic significance, permitting a fast identification of potentially pathogenic V. parahaemolyticus. This method is relatively easy to perform and less time consuming when compared with the use of concentrated extracts from disrupted cells.

Another purpose of the present work was to study the thermal resistance of V. parahaemolyticus ATCC 17802. The test was carried out applying the flask method, with a 24 hour old cell suspension being heated in peptone salt water, pH 7.2, as suspending menstruum. The "D value" was the parameter used to express the heat resistance, being determined at 113°, 118.4° and 122°F. The results showed a low thermal resistance, with D113= 38.2 min, D118.4= 2.01 min and D122= 0.51 min.

A comparative study related to the influence of the composition of the recovery medium on the apparent heat resistance, revealed higher survival rates, and consequently higher "D values" when Vibrio *Maintenance Medium was employed. A statistically significant difference (at the level of five percent) was observed when compared with Brain Heart Infusion Agar plus 2.5 percent NaCl and Trypticase Soy Agar plus 2.5 percent NaCl. No significant difference was observed between the two other media.*

INTRODUÇÃO

A presença de *Vibrio parahaemolyticus* em alimentos de origem marinha é de importância à saúde pública. No Japão, durante o verão, é o responsável por mais surtos do que qualquer outro tipo de patógeno comumente encontrado em alimentos. Essa bactéria parece ter ampla distribuição no meio marinho, particularmente em águas litorâneas e sua ocorrência tem sido confirmada nos Estados Unidos. Não há registros nos Estados Unidos de surtos de infecção por alimentos devidos a *V. parahaemolyticus*, mas segundo DACK (1966) e BRYAN (1969), isso não exclui a possibilidade de tal ocorrência, pois que a maioria dos surtos é relatada apenas para botulismo, salmonelose e intoxicações estafilocócicas. A detecção e a caracterização do *V. parahaemolyticus*, envolvem seqüências laboriosas de técnicas de isolamento e reações bioquímicas, para poder diferenciá-lo de outros vibriões marinhos, tais como *V. anguillarum* e *V. alginoluticus*, comumente presentes no mesmo ambiente, mas não considerados como patogênicos ao homem.

Uma das finalidades desta pesquisa foi a caracterização de *V. parahaemolyticus* e a sua diferenciação de outros vibriões marinhos são patogênicos, com base em testes "in vitro" de seus ênzimos extracelulares e utilizando-se a electroforese plana em gel.

O modêlo característico das reações enzímicas permitiria uma diferenciação mais rápida e precisa.

Outro objetivo dêste estudo foi adquirir um melhor conhecimento da resistência térmica de *V. parahaemolyticus*, pelo estudo de sua destruição a diferentes temperaturas.

REVISÃO DA LITERATURA

Experimento I

Um grupo de organismos halófilos facultativos, tem sido considerado como agente causal de uma infecção por alimentos, que ocorre no Japão durante os meses de verão. Êsses surtos geralmente estão relacionados com o consumo de peixe marinho cru e de diversos alimentos preparados, tais como "shirasuboshi" (sardinhas jovens semi-sêcas) e "izushi" (peixe cru, vegetais, arroz, sal e vinagre), que são alimentos tradicionais do povo japonês.

Êsses organismos foram isolados pela primeira vez em 1951, de materiais de autópsia, colhidos após um surto de gastroenterite. Devido à pouca atividade dos organismos em meio de cultura comum, aos caracteres de coloração bipolar e às propriedades hemolíticas fracas, êles foram considerados como membros do gênero *Pasteurella*, sendo sugerido o nome *P.parahaemolyticus* para o organismo causal (citado por MIYAMOTO e outros (1961). Segundo SAKASAKI (1963), o halofilismo do organismo não era conhecido, pois que isto o teria excluído do gênero *Pasteurella*.

TAKIKAWA (1958) isolou diversas linhagens de surtos de gastroenterite, indicando o caráter halofílico e identificando o organismo como sendo semelhante às espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, mas diferindo sorològicamente. Propôs, assim, o nome *P. enteritis*, para êsses organismos. MIYAMOTO e

outros (1961), ao estudarem essas bactérias, propuseram um nôvo gênero, *Oceanomonas*. Os autores consideraram que essas linhagens mostravam algumas características distintas, com a exigência de baixo teor de sal, diferenciando-as do gênero *Aeromonas* (organismos de água doce) e de halófilos, de maior exigência de sal. Segundo os mesmos autores, diferenciavam-se do *Vibrio*, pois que nunca eram encontrados na forma encurvada típica, que é vista em *Vibrio*, e freqüentemente mostravam pleomorfismo, como por exemplo, formas esféricas. Os autores não consideraram a sensibilidade ao agente vibriostático.2-4 diamino 4-7 diisopropilpteridina, importante do ponto-de-vista taxonômico. Três espécies foram consideradas nesse nôvo gênero: *O. enteritidis*, *O. parahaemolyticus* e *O. alginolytica*.

Estudos definitivos sôbre as propriedades químicas, culturais, morfológicas e fisiológicas, foram relatados por SAKAZAKI (1963). Êsse autor não considerou o halofilismo como chave importante para a classificação, acentuado que o caráter halofílico se modificava com as condições de crescimento. Concluiu que o organismo mostrava uma grande semelhança com as características do gênero *Vibrio*, propondo o nome *V. parahaemolyticus* (FUJINO e outros, 1953; SAKAZAKI e outros, 1963) para essa espécie. A espécie foi dividida em dois subgrupos, com base no crescimento em água com peptona contento 7 e 10% de NaCl, na reação de Voges Proskauer e na fermentação de sacarose e arabinose, com os membros do subgrupo 1 sendo enteropatogênicos não coleragênicos e aquêles do grupo 2 de patogenicidade questionável.

Em 1965, ZEN YOJI e outros (citado por SAKAZAKI, 1968), aplicando técnicas de computador, sugeriram que os organismos no subgrupo 2 deviam ser excluídos de *V. parahaemolyticus*, pois que o valor de similaridade entre os dois biótipos era de aproximadamente 80%. Isto foi confirmado mais tarde por SAKAZAKI (1968), que propôs o nome de *V. alginolyticus* às linhagens do subgrupo 2. Esta bactéria é mais freqüentemente isolada de águas marinhas costeiras e de

peixes do mar do que o *V. parahaemolyticus* e, algumas vêzes, é encontrada nas fezes de pacientes humanos afetados de gastroenterite (SAKAZAKI, 1969, pág. 123).

V. anguillarum é outro *Vibrio* marinho freqüentemente confundido com *V. parahaemolyticus* em técnicas de isolamento. Originalmente associado com a doença vermelha da enguia, êsse organismo foi descrito mais tarde por SMITH (1961) como responsável por uma moléstia do "finnock" (*Salmo trutta* jovem) na Escócia. Recentemente, CIZAR E FRYER (1969) identificaram êsse organismo como agente causal de uma epizoótia de vibriose em salmões "chinook" jovens (oncorhynchus tshawytscha) criados num represamento de água do mar no litoral de Oregon.

Êsses organismos são encontrados apenas em águas marinhas e em peixes do mar recém-capturados, jamais em fezes de pacientes sofrendo de gastroenterite (SAKAZAKI, 1969, p. 123).

No que concerne ao habitat e à distribuição do *V. parahaemolyticus*, julgou-se que a sua presença se restringia às águas litorâneas japonêsas. Todavia, trabalhos posteriores demonstraram uma larga distribuição nas águas marinhas costeiras dos Estados Unidos, Filipinas, Formosa, Hong Kong e Singapura (SAKAZAKI), 1969, p. 123). Nos Estados Unidos, foi isolado pela primeira vez por BAROSS e LISTON (1968) de sedimentos costeiros de Puget Sound e Washington. O organismo foi encontrado em números relativamente grandes, durante o verão, em todos os sedimentos de água de Puget Sound em amostras de ostras. Entretanto, em amostras coletadas durante o início da primavera e princípios do outono, as contagens de *V. parahaemolyticus* eram muito baixas. HORIE e outros (1967) observaram que nenhum dos organismos foi isolado em amostras de águas de mar alto, mas, por outro lado, foi revelado que as águas marinhas costeiras ou águas dos estuários continham até 10^5 de *V. parahaemolyticus* por 1.000 ml de amostra na estação do verão. WARD (1968) isolou organismos relacionados ao *V. parahaemolyticus*

de amostras de sedimentos congelados das duas costas dos Estados Unidos. KRANTZ e COLWELL (1969) isolaram linhagens de *V. parahaemolyticus* e caranguejos azuis moribundos e letárgicos na Baía de Chesapeake (E.U.A.). Êsses autores sugeriram que essa bactéria faz parte da flora marinha e, ocasionalmente, invade os animais marinhos, nos quais se podem tornar um problema em potencial à saúde humana.

Recentemente, conforme relatado por TWEDT, SPAULDING e HALL (1969), suspeitos *V. parahaemolyticus* foram isolados de infecções localizadas de tecidos, adquiridas por indivíduos vivendo nas regiões costeiras dos Estados Unidos. Segundo os autores, êsses vibriões patogênicos estão envolvidos num modo insuspeitado de infecção, por via de um ferimento ou danificação de tecido.

A enteropatogenicidade do *V. parahaemolyticus* tem sido estudada por diversos autores. ZEN YOJI e outros (1965) concluíram que era do tipo infeccioso, com o desenvolvimento de gastroenterite na maioria dos casos. Os sintomas surgem comumente 12 horas depois do alimento contaminado ter sido ingerido, se bem que o intervalo possa ser tão breve como duas horas, ou tão prolongado como 48 horas, caracterizando-se por dores abdominais a diarréia, comumente associadas a náuseas e vômitos; ligeira febre, calafrios e cefaléia também são observadas na maioria dos casos e moléstia similar à desinteria, com excreção de fezes com muco e sangue, também pode ocorrer (SAKAZAKI, 1969, p.124) . A incidência de alimentos contaminados é muito alta no Japão e, segundo o Ministério do Bem-Estar do Japão, 73,1% dos surtos, em 1963, foram causados por *V. parahaemolyticus* (SAKAZAKI, 1969, p. 125).

Não está bem definido se todos os membros da espécie são patogênicos. SAKAZAKI (1963) sugeriu que todos os membros de *V. parahaemolyticus* podiam ser enteropatogênicos a sêres humanos. O autor descreveu que tôdas as culturas dos vibriões revelaram uma zona hemolítica ao redor das colônias em placas comuns de

ágar-sangue. Observou-se, mais tarde, que vibriões isolados de casos de diarréia humana revelavam atividade hemolítica quando plaqueados em Brain Heart Infusion Agar não autoclavado, contendo 5% de sangue humano, 3% de cloreto de sódio e 0,001% de violeta-cristal. Entretanto, culturas isoladas de peixe marinho e água do mar, não mostravam uma tal atividade nesse meio de cultura modificado (SAKAZAKI, 1968). Testes de alimentação com voluntários humanos levados a efeito para esclarecer a enteropatogenicidade das linhagens não hemolíticas, revelaram que nenhum dos participantes ficou doente, ainda que lhes tivessem sido administradas mais de 10^9 células de vibriões.

Baseando.se nesses resultados, concluiu-se que os vibriões possuiam dois fatôres hemolíticos: um comum a todos, e outro característico de algumas culturas. Mais tarde, foi observado que o fator comum era inibido pela adição de 0,1% de glicose ao meio, ligado aos componentes da célula e termolábeis. Por outro lado, o fator hemolítico, encontrado em linhagens de casos clínicos humanos, era independente das células e termoestável (citado por SAKAZAKI, 1968). Na 41a. Reunião Geral da Sociedade de Bacteriologia do Japão, em 1968, FUJINO, o primeiro descobridor do *V. parahaemolyticus*, propôs que êsse tipo particular de hemólise deveria ser chamado "fenômeno de Kanagawa" (Miyamoto e outros, 1969).

A epidemiologia do *V. parahaemolyticus* não é clara. MIYAMOTO e outros, 1969) observaram 95,3% de reações positivas no "fenômeno de Kanagawa" em linhagens isoladas de pacientes suspeitos de desinteria, e 0,54 e 0,48% de reações positivas de linhagens isoladas de água marinha e amostras de peixe, respectivamente. Entretanto, investigações epidemiológicas, no Japão, demonstraram que peixes do mar e seus produtos são os agentes causadores de surtos de gastroenterite. Não obstante, pràticamente tôdas as culturas isoladas de peixe do mar são consideradas não patogênicas ao homem. Segundo SAKAZAKI (1969, p. 122), futuras investigações serão necessárias, a fim de esclarecer êsse problema.

O isolamento e a identificação de *V. parahaemolyticus* são técnicas trabalhosas, não havendo plena concordância entre os autores, quanto ao que constitui os critérios primários para a identificação.

SAKAZAKI, IWANAMI e TAMURA (1968 a) desenvolveram um esquema sorológico de classificação para *V. parahaemolyticus*, baseado em 11 grupos O e 41 antigenos K, sendo estabelecido um esquema antigênico para 41 sorótipos de *Vibrio*. Observou-se que tôdas as culturas das espécies possuíam um antígeno H comum. Entretanto, outros autores sugeriram que, até o presente, não há base sorológica para os isolamentos de *V. parahaemolyticus*, recomendando-se que um esquema de identificação química seja completado, a fim de assegurar a correta identificação do gênero e das espécies (USPHS, FDA, 1969, Sec. BAM 14.03).

SAKAZAKI (1963, 1965, 1969) relatou que *V. parahaemolyticus* não fermenta sacarose. Todavia, BAROSS e LISTON (1968) observaram que 7 das 40 linhagens obtidas do Japão, fermentaram êsse açúcar. TWEDT e outros (1969) observaram estreitas semelhanças morfológicas, culturais e fisiológicas, entre as linhagens isoladas de diferentes fontes. Entretanto, seus resultados não concordaram completamente com os relatados por SAKAZAKI (1963), particularmente no que se refere à tolerância ao sal e à fermentação de arabinose e celobiose. WARD (1968) observou que muitos dos seus isolados satisfazendo ao esquema japonês das características culturais, falharam em reagir sorològicamente e, por outro lado, um número de isolados sorològicamente reativos não se adaptava ao esquema bioquímico de classificação proposto.

O emprêgo da electroforese em gel de amido na taxonomia representou uma contribuição importante à identificação dos microrganismos. ORNSTEIN (1964) e DAVIS (1964) introduziram a electroforese em disco utilizando géis de poliecrilamida que, de acôrco com o segundo autor, oferecia meios de flexibilidade e versatilidade não fàcilmente atingíveis com géis de amido

naquela época. De estudos da natureza físico-química dos ênzimos nos tecidos ou células, descobriu-se que ênzimos simples existiam em formas multimoleculares. MARKERT e MOLLER (1959) propuseram o têrmo "isozima" para caracterizar essas formas. Observou-se que ênzimos semelhantes, isolados de organismos diferentes, demonstravam ter amplas variações em suas propriedades electroforéticas, mas organismos afins demonstravam freqüentemente modelos semelhantes ou quase idênticos. NORRIS (1964), ao estudar o *Bacillus thuringiensis*, dividiu essas bactérias em dez tipos de estérase, correlacionados com a possessão de antígenos H. O autor deu ênfase ao valor da electroforese em gel, como auxílio à taxonomia, particularmente relacionada aos sistemas de estérase bacteriana.

LUND (1965) trabalhando com electroforese em gel dos componentes protéicos solúveis e estérases de alguns estreptococos do grupo D, demonstrou que linhagens de *Streptococos faecalis* e suas variedades "zymogenes" e "liquefaciens" possuiam modelos protéicos muito semelhantes, que contrastavam fortemente com o modêlo mostrado por *S. faecium* e *S. durans*.

ROBINSON (1968, p. 85), ao estudar as bactérias corineformes, fêz uma diferenciação primária baseada na composição de aminoácidos do mucopeptídeo da parede celular, seguida de uma posterior diferenciação, dentro dos grupos, baseada na electroforese a gel de amido dos extratos livres da célula e posterior identificação dos modelos para catálase, peroxídase e estérase.

LEVANT (1969) empregando a electroforese em gel de poliacrilamida dos sobrenadantes concentrados de várias linhagens de *Clostridium botulinum* tipos A, B, C, E e F, observou variações com isozimos proteolíticos, lípase, lecitínases e diafórases. O autor detectou uma única banda de diafórase nos tipos A ou B, duas bandas nos tipos tóxicos E e F e nenhuma diafórase nas formas não tóxicas.

A taxonomia do gênero *Vibrio* tem sofrido diversas revisões nos anos recentes e, segundo COLDWELL (1968), alguns problemas permanecem, particularmente quanto à diferenciação das espécies dentro do gênero *Vibrio* e à solução das relações de *Vibrio* com os gêneros *Pseudomonadaceae* e *Enterobacteriaceae*. ADEYEMO, ELLINGSEN e COLWELL (1967) estudando linhagens de *Vibrio choleae, V. cholerae* variedade El Tor e linhagens afins de *Vibrio* marinho e não marinho, compararam os dados obticos por taxonomia numérica, composição das bases de DNA e análises de proteína total e estérase por electroforese em gel de amido. Os resultados indicaram que as linhagens formavam um grupo relativamente homogêneo ao nível de espécie na relação taxonômica. As variações nos modelos da banda de estérase que foram observadas, não correlacionavam com os subgrupos de *V. choleae, V. cholerae* var. El Tor e "Vibriões não coleragênicos", os dados Adansonianos e composição da base do DNA suportando as conclusões obtidas dos dados electroforéticos. Os mesmos autores concluíram que o método de análise enzímica pareceu fornecer uma informação valiosa e taxonômicamente útil.

COLWELL, ADEYEMO e KIRTLAND (1968) estudaram a estérase e a composição das bases do DNA das linhagens de *V. cholerae, V. parahaemolyticus* e vibriões não coleragênicos e marinhos. Os restultados demonstraram similaridade quanto os vibriões foram examinados por métodos electroforéticos, sendo suas proteínas solúveis similares. Os modelos de banda de estérase das linhagens de *Vibrio*, com exceção dos vibriões marinhos, sugeriram um grau ainda mais alto de similaridade, sem modêlo distinto ou separado para os vibriões El Tor ou não coleragênicos. *V. parahaemolyticus* representou um grupo homogêneo, com uma banda de estérase correspondente à banda mais inferior da *V. cholerae*. De acôrdo com os autores, a análise da composição das bases DNA para essas linhagens, sugeriu uma posição intermediária entre *V. cholerae* e *Vibrio* sp. marinho. Concluíram, também, que a informação derivada das análises de estérase pareciam ser de considerável valor taxonômico.

Experimento II

Quando células ou esporos bacterianos são expostos ao calor, a proporção de sobreviventes em qualquer tempo pode ser locada em gráfico, em relação ao tempo de aquecimento, para dar uma curva de sobrevivência. Essa curva é freqüentemente exponencial e uma linha reta é obtida quando os logarítimos dos sobreviventes são locados em gráfico em relação ao tempo, em unidades aritméticas. Essa forma de curva é típica para as reações químicas de primeira ordem, e tem sido suposto que a morte das células microbianas se deve a um acontecimento único letal, que ocorre ao acaso. Êsse acontecimento poderia ser a desnaturação de uma proteína essencial (RIEMANN, 1969, p. 491). Entretanto, observações posteriores mostraram que as células são destruídas pela ação conjunta de um número de acontecimentos, tais como a decomposição dos ribossomas, perda da função osmótica das células bacterianas e o extravazamento de um exsudato contendo peptídeos, aminoácidos e ácidos nucléicos (RIEMANN, 1969, p. 492).

ORDAL (1970) observou em culturas de *Staphylococcus aureus* sujeitas a tratamento subletal, a ocorrência de lesões, particularmente a danificação da membrana citoplasmática, com o conseqüente extravazamento dos constituintes citoplasmáticos da célula. Havia, também, uma alteração das capacidades metabólicas da célula, com uma inativação térmica seletiva dos ênzimos celulares e uma desnaturação parcial de suas proteínas, e uma degradação do RNA robossômico, devido à ativação térmica dos ênzimos que degredam o t RNA, provàvelmente uma ribonucléase e uma fosforílase polinucleótica.

A inativação térmica das células vegetativas ou esporos é comumente expressa pelo emprêgo de dois parâmetros. O valor "D", também denominado de constante da taxa letal ou tempo de redução decimal, é o tempo requerido a qualquer temperatura para destruir 90% dos esporos ou células vegetativas de um dado organismo. Numèricamente, é igual ao número de minutos

requeridos para a curva de sobrevivência atravessar um ciclo logarítmico e, matemàticamente, é igual à recíproca da inclinação da curva de sobrevivência (STUMBO, 1965, p. 107). A curva de sobrevivência é obtida locando-se em gráfico logarítimos na base 10 do número de sobreviventes em relação aos tempos de exposição.

O valor "Z" representa os graus Fahrenheit requeridos para a curva da destruição térmica atravessar um ciclo logarítmico e, matemàticamente, é igual à recíproca da inclinação da curva da destruição térmica (STUMBO, 1965, p. 110). A curva de destruição térmica é mais conveniente construída, locando-se, no sentido das ordenadas, os logarítimos de D ou algum múltiplo de D, em relação às temperaturas de exposição,no sentido das abscissas. Neste caso particular, a curva de destruição térmica é chamada"curva fantasma do tempo de destruição térmica", porque supõe-se ter direção, mas não posição (SCHMIDT, 1954, p. 730). De acôrdo com THOMAS, WHITE e LINGREE (1966), o valor desta curva está na sua independência da concentração inicial do inóculo. A inclinação é suposta ser um valor constante, independente do meio de cultura, e pode ser extrapolada a temperaturas mais altas do que as realmente testadas.

Segundo SCHMIDT (1954, p. 175), podem haver três tipos gerais de fatôres que afetam a resistência térmica: 1) resistência intrínseca, isto é, para as mesmas condições de crescimento, diferentes linhagens da mesma espécie podem produzir suspensões de células ou esporos tendo graus amplamente diferentes de resistência; 2) influências ambientais ativas durante a formação das células ou esporos, como, por exemplo, pelos efeitos da idade, incubação, temperatura e composição do meio nutriente; 3) influências ambientais ativas durante o aquecimento da suspensão, compreendendo tôdas as variáveis, tais domo pH, carboidrato, conteúdo protéico e graxo do substrato, colóides (tais como amido ou solo), sal e outros compostos solúveis orgânicos e inorgânicos presentes.

STUMBO (1965, p. 101) sugeriu que o pH do meio, a concentração de sal, gordura e açúcar e o conteúdo de água, são alguns dos fatôres principais responsáveis pela variação na resistência térmica. O mesmo autor (1965, p. 67), deu ênfase à importância da natureza do meio em que as suspensões aquecidas de células ou esporos são subcultivadas. De acôrdo com o meio de recuperação, as contagens de célula ou esporos viáveis podem variar e a curva observada de sobrevivência pode ser alterada.

Desde que a resistência térmica dos microrganismos depende de tantos fatôres, isto parcialmente explicaria as diferenças na resistência térmica aparente de uma mesma bactéria obtida por diferentes autores, em condições variáveis. Graças à grande variação na resistência térmica de esporos de diferentes suspensões, mesmo que preparadas sob condições aparentemente idênticas e, também, às variações da composição dos mesmos produtos alimentícios, considerou-se aconselhável incluir, na maioria das determinações de resistência térmica, um meio padrão de aquecimento como referência. Êsse meio é um tampão fosfato, preparado pela mistura de M/15 Na_2HPO_4 e M/15 KH_2PO_4, a fim de dar um pH final de 7,0 (NCA, 1968, p. 181).

THOMAS e outros (1966) mencionam que para células vegetativas o valor "Z" comumente encontrado é de cêrca de 5,6±1,1°C. RIEMANN (1969, p. 197) afirma que o valor "Z" para a maioria das linhagens de *Salmonella* é cêrca de 4° a 5°C, valores algo mais altos (5,6° a 6,4°C) sendo observado para *S. senftenberg* 775 W. No que concerne ao *Staphylococcus aureus*, os relatados valores "Z" observados, variam de 4,7° a 7,3°C.

A resistência do *Vibrio cholerae* à temperatura não é alta, sendo destruído em 10' a 55°C; é particularmente sensível à secagem e não sobrevive por muito tempo em associação com bacilos saprófilos comuns do solo e da água (BORROWS e outros, 1968, p. 531). SMITH (1961) observou que *V. anguillarum*, o agente causal de vibrioses em "finnock" suportou o aquecimento a 40° por 10', mas não a 45° durante o mesmo tempo.

FUJINO (1964) observou que em peixe submetido à pasteurização, *V. parahaemolyticus* foi completamente destruído por um tratamento térmico de 50°C por 20', ou 55° por 10', ou 65°C por 5'. TENMYO (1966) observou que *V. parahaemolyticus* podia ser destruído se aquecido em solução de peptona a 55°C por 10', ou a 60°C por 5'. Os organismos também eram mortos se suspensos em água destilada durante breve período de tempo. Baseado nesses resultados, o autor sugeriu que surtos podiam ser prevenidos, lavando-se suficientemente os peixes marinhos em água fresca ou em água fervente, conservando-se refrigerados os peixes marinhos e derivados, assim como cozinhando-os antes de se comer.

Experimento I

Electroforese a gel dos sobrenadantes de cultura de *V. parahaemolyticus* e vibriões marinhos afins

Materiais e Métodos

Microrganismos utilizados

Os microrganismos foram obtidos das seguintes fontes:

V. parahaemolyticus	Isolamento original	Fonte
ATCC 17802, ATCC 17803	Isolados de casos de envenenamento pelo alimento "shirazu", no Japão	ATCC
V. parahaemolyticus		
Sj-K4, SjK20, Sj-K32	Água e peixe do mar, fezes de pacientes no Japão	Dr.R.M Twedt, UDSHEW Serviço de Saúde Pública.
"Suspeito" *V. parahaemoliticus* - CDCA1334, CDC-A3454, CDC - 8198	Isolados de pacientes nos E.U.A.	Dr.R.M.Twedt
Vibriões marinhos não patogênicos CB-25	Lodo da Baía de Chesapeake (E.U.A')	Dr.R.M.Twedt
CB - 64	Água da Baía de Chesapeake (E.U.A.)	Dr.R.M.Twedt
CB - 153	Ostras da Baía de Chesapeake (E.U.A.)	Dr.R.M.Twedt
V. anguillarum LS - 68-1, LS - 68 - 2, LS - 68 - 3	Isolado de salmão "chinook", doente, nas costas de Oregon (E.U.A.)	Dr.J.L.Fryer, Dept. de Microbiologia Un. do Est. de Oregon
V. alginolyticus ATCC 17749	Isolado de peixe cavala, deteriorado, no Japão	ATCC

Segundo TWEDT e outros (1969), linhagens SJ de *V. parahaemolyticus* foram isoladas das fezes de pacientes que sofriam de gastroenterite, ou de alimentos implicados em surtos de envenenamento por alimentos. As linhagens CDC suspeitas de *V. parahaemolyticus* foram isoladas de infecções adquiridas por nadadores em contacto com o ambiente marinho, sendo cultivados de sangue, escarro, secreção dos olhos e ouvidos, de lesões do pulso, pernas e pés.

Manutenção de culturas

Culturas estoques de *V. parahaemolyticus* ATCC, SJ e também linhagens CDC, *V. anguillarum* e *V. alginolyticus* foram mantidas em ágar inclinado em tubos de tampa de rôsca, à temperatura ambiente, utilizando-se Trypticase Soy Agar (BBL) mais 2,5% de NaCl como meio de cultivo. Linhagens CB de *Vibrio* marinho foram mantidas usando-se o meio com a composição proposta por COLWELL e outros (1968): 2,4% de NaCl, 0,07% de KCl, 0,53% de $Mg.Cl_2$, $6H_2O$, 0,70% de $MgSO_4.7H_2O$, 1% de protéose peptona (Difco), 0,3% de extrato de lêvedos (Difco) com pH final de 7,2. Através de todo o experimento, êsse meio será mencionado como Meio de Manutenção de *Vibrio*.

Antes de serem utilizadas, as culturas eram isoladas em placas contendo Trypticase Soy Agar ou Meio de Manutenção, de acôrdo com a linhagem, sendo incubadas durante 24 horas, a 28°C no caso de *V. anquillarum* e a 37°C para tôdas as demais culturas. Após crescimento observável, as culturas foram coradas em GRAM e examinadas com microscópio, para verificar a presença de eventual contaminação.

Preparo de sobrenadantes de cultura

Uma modificação do método de cultura em saco proposto por DONNELY e outros (1967), para a produção de enterotoxina estafilocócica, foi empregada para o preparo de sobrenadantes concentrados. O conjunto de cultura em saco foi feito com tubo de celulose para

diálise (Scientific Products), aproximadamente de 7,5 cm de largura e 40 cm de comprimento. Essa peça foi lavada totalmente em água destilada e amarrada em uma das extremidades, depois introduzida em um Erlenmeyer de 500 ml. Duzentos ml de "Brain Heart Infusion" de dupla concentração (BBL) mais 2,5% de NaCl foram colocados no saco e a outra extremidade do tubo foi também amarrada. O frasco Erlenmeyer foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e 100 ml de tampão fosfato esterilizado (0,2 M $Na_2 HPO_4$ e 0,2 M NaH_2PO_4, pH 7,2), mais 2,5% de NaCl foram adicionados ao frasco do lado de fora do saco. O crescimento em ágar inclinado foi lavado em 2 ml da solução tampão e adicionado à diluição tampão circundando o saco.

As culturas em saco foram incubadas durante 48 horas num agitador rotativo, à temperatura de 28°C para *V. anguillarum*, e 37°C, para tôdas as outras culturas. O crescimento circundando a bôlsa foi removido dos frascos e a maioria das células separadas por centrifugação a 17.300 g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi posteriormente concentrado pela colocação em tubo de diálise (Scientific Products) e dialisado contra polietileno glicol 6.000 (Fisher) a 50% ($\frac{P}{V}$), durante 6 horas a 4°C. Isto resultou numa redução de volume para cêrca de 2 ml, portanto, uma concentração de 50 vêzes. O concentrado foi armazenado em tubos pequenos de tampa, rosqueados e mantidos a 4°C para uso posterior. Um contrôle foi preparado seguindo-se a mesma técnica, mas sem inoculação com microrganismos.

Electroforese plana em gel

Géis de poliacrilamida foram preparados de acôrdo com o método de DAVIS (1964), utilizando-se uma unidade electroforética desenvolvida para electroforese plana em gel. LEVANT (1969) descreve as características e a operação dessa unidade.

O sobrenadante concentrado (0,1 ml) foi diluído com tampão Tris-glicina, de pH 8,3, na relação de

1:5 e delicadamente colocado na superfície do gel de poro largo. A superfície do gel foi dividida em sua extensão em 8 partes (2 cm cada), usando-se tubos plásticos (Tygon), de modo que 8 sobrenadantes concentrados diferentes podiam ser submetidos à electroforese ao mesmo tempo. A corrente foi ajustada para 50 miliamperes e a electroforese continuada até que a frente do corante de rastreio houvesse migrado até cêrca de 0,5 cm do fundo do gel de pequeno poro (aproximadamente 1 hora). Após a electroforese, os géis contendo as proteínas foram removidos do aparelho, cortados em faixas verticais e submetidos aos testes enzímicos.

ANÁLISES DO GEL

Proteína total

Após o fracionamento electroforético, os géis de poliacrilamida foram suspensos em 12,5% de ácido tricloroacético (TCA). Após 30 minutos, foram imersos numa solução de corante, preparada por uma diluição de 1:20 em 12,5% de TCA de uma solução estoque aquosa de 1% de Coomassie Blue (Colab.). Após 12 horas de coloração, os géis foram transferidos em TCA a 10% e fotografados.

Testes para ênzimos

Os géis submetidos à electroforese foram cortados em faixas estreitas e colocados sôbre uma lâmina de microscópio e depois cobertos com 1,5 ml do substrato próprio embebido em ágar. Nos testes de fosfátases e estérases, os géis foram imersos numa solução contendo o substrato para o ênzimo em estudo.

Lípases

Tween 80 (polioxietileno sorbitan mono-oleato) como substrato. Foi empregado o método descrito por

SIERRA (1957) para detectar atividade lipolítica, sendo os géis cobertos com um meio contendo 0,25 g de NaCl, 0,005 g de $CaCl_2.H_2O$, 0,5 ml de "Tween 80" (concentração final de 1%) 0,5 g de Ionagar nº 2 (Oxoid) e água destilada até 50 ml, e o pH final ajustado para 7,4. Após incubação a 30ºC, uma reação positiva era indicada pela formação de uma faixa opaca de precipitação, devida à formação de sais de cálcio.

Gema de ôvo como substrato. Gema de ôvo foi diluída em solução salina fisiológica a 1:1. Cinco por cento dessa solução foram adicionados a uma solução de 1,5% de Ionagar nº 2, à temperatura de 45ºC e imediatamente colocada sôbre o gel. A reação positiva ra indicada pela formação de uma faixa de precipitado opaca.

Ênzimos proteolíticos

Caseína como substrato. Cinco ml de leite desnatado reconstituído e esterilizado foram adicionados a cinco ml de Ionagar nº 2 a 1,5% em solução salina. A preparação foi montada em lâmina à temperatura de 45°C. Após incubação a 30°C, os géis foram desenvolvidos por imersão numa solução contendo 1,5 g de $HgCl_2$, 2 ml de HCl concentrado e 10 ml de água. Uma reação positiva foi indicada pela formação de uma faixa clara no gel, tornado opaco pela adição do reagente de desenvolvimento.

Gelatina como substrato. Gelatina (Difco) na quantidade de 0,5 g e 0,5 g de Ionagar nº 2 foram dissolvidos em 50 ml de salina fisiológica e a mistura aquecida para dissolver o ágar e aplicada ao gel a 45°C. O mesmo reagente de desenvolvimento foi empregado e um resultado positivo foi indicado por faixas claras no gel, tornado opaco pela adição do reagente.

Amílase

Amido solúvel (Difco) na quantidade de 0,1 g e 0,5 g de Ionagar nº 2 foram adicionados a 50 ml de

salina fisiológica, montando-se na lâmina após o ágar ter sido dissolvido e à temperatura de 45°C. Após incubação a 30°C, o gel foi analisado por imersão numa solução contendo 0,1 g de iôdo, 0,2 g de KI e 30 ml de água destilada. Um resultado positivo era indicado pela formação de uma faixa clara no gel, tornando-se azul-púrpura pela adição do reagente de desenvolvimento.

Desoxirribonucléase

Ágar DNA foi preparado adicionando-se 0,2 de DNA (timo de boi, tipo A, Calbiochem) (p/v) a 1% de Ionagar nº 2 em solução salina, sendo o substrato colocado nos géis. Após incubação a 30°C, a presença de DNase era indicada por faixas claras no meio, tornado opaco pela adição de reagente de desenvolvimento (1 N HCl).

Hemólise

Ionagar nº 2 na quantidade de 1,5 g foi dissolvido em 100 ml de salina fisiológica. Depois que o ágar foi liquefeito à temperatura de 45°C, foram adicionados 5 ml de sangue de coelho desfibrinado e o meio colocado sôbre o gel. Uma reação positiva era indicada pela formação de faixas claras.

Fenômeno de Kanagawa

Foi empregada uma modificação do meio de Wagatsuma (MIYAMOTO e outros, 1969), com a seguinte composição: 7% de NaCl, 0,5% de K_2HPO_4 e 1,5% de Ionagar nº 2, adicionados a 100 ml de água destilada. Após dissolução por aquecimento, foram adicionados manitol na concentração de 1%, 0,1% de violeta cristal (em solução alcoólica a 1%) e 5% de sangue de coelho, fresco e desfibrinado, e o meio colocado sôbre o gel.

Fosfátases

Fosfátase alcalina. Foi empregado o sistema proposto por BURSTONE (1962).

Substrato - 1 ml de propionato alfa naftilo (Sigma) a 1% preparado por dissolução de 0,1 g em 10 ml de acetona.

Sal de diazônio - 20 mg de Fast Blue RR.

Tampão - 40 ml de tampão 0,1 M Tris-HCl,pH 7,0.

Os reagentes foram misturados imediatamente antes do emprêgo e os géis imersos na solução, sendo indicada uma reação positiva pela formação de faixas azul-escuras.

Devido ao fato que os sais de diazônio também combinam com grupos funcionais de proteínas, tais como o grupo amino livre dos resíduos de lisil, também foram preparados controles negativos nas reações para fosfátases e estérases. Êsses controles foram preparados inoculando-se os géis em soluções contendo o sal de diazônio, mas não o substrato sintético.

RESULTADOS E DUSCUSSÃO

Proteínas totais

Os resultados mostraram a presença de um grande número de proteínas nos sobrenadantes de cultura, porém sendo observadas diferenças concernentes ao número de bandas e o modêlo de proteína total. Entretanto, uma semelhança mais acentuada foi observada entre os modelos de *V. parahaemolyticus* linhagens ATCC e SJ) e o "suspeito" *V. parahaemolyticus*, isolado de infecção cutânea (linhagens CDC).

A presença de bandas comuns com as linhagens de *V. parahaemolyticus* também foi observada em relação ao *Vibrio* marinho não patogênico (linhagens CB), mas sem uma grande semelhança no modêlo de proteína total. Tôdas as linhagens de *V. anguillarum* mostraram um modêlo relativamente uniforme e diferente daquele de *V. parahaemolyticus*. A figura 1 mostra uma comparação entre linhagens de *V. parahaemolyticus*, e a figura 2, o modêlo de proteína total para as diferentes culturas examinadas.

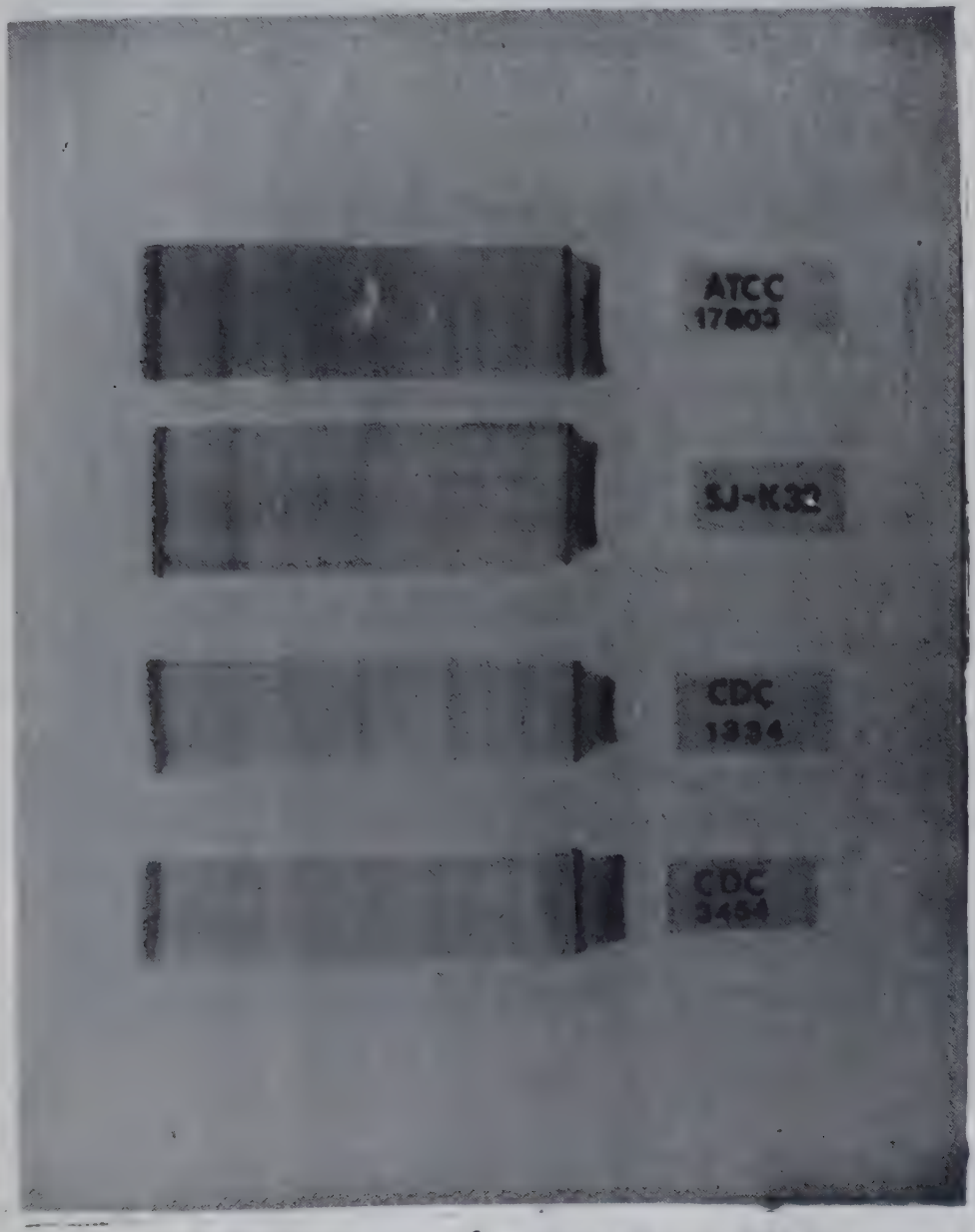


Figura 1. Modelo de proteína total de linhagens de *V. parahaemolyticus* e de culturas isoladas de infecção cutânea.

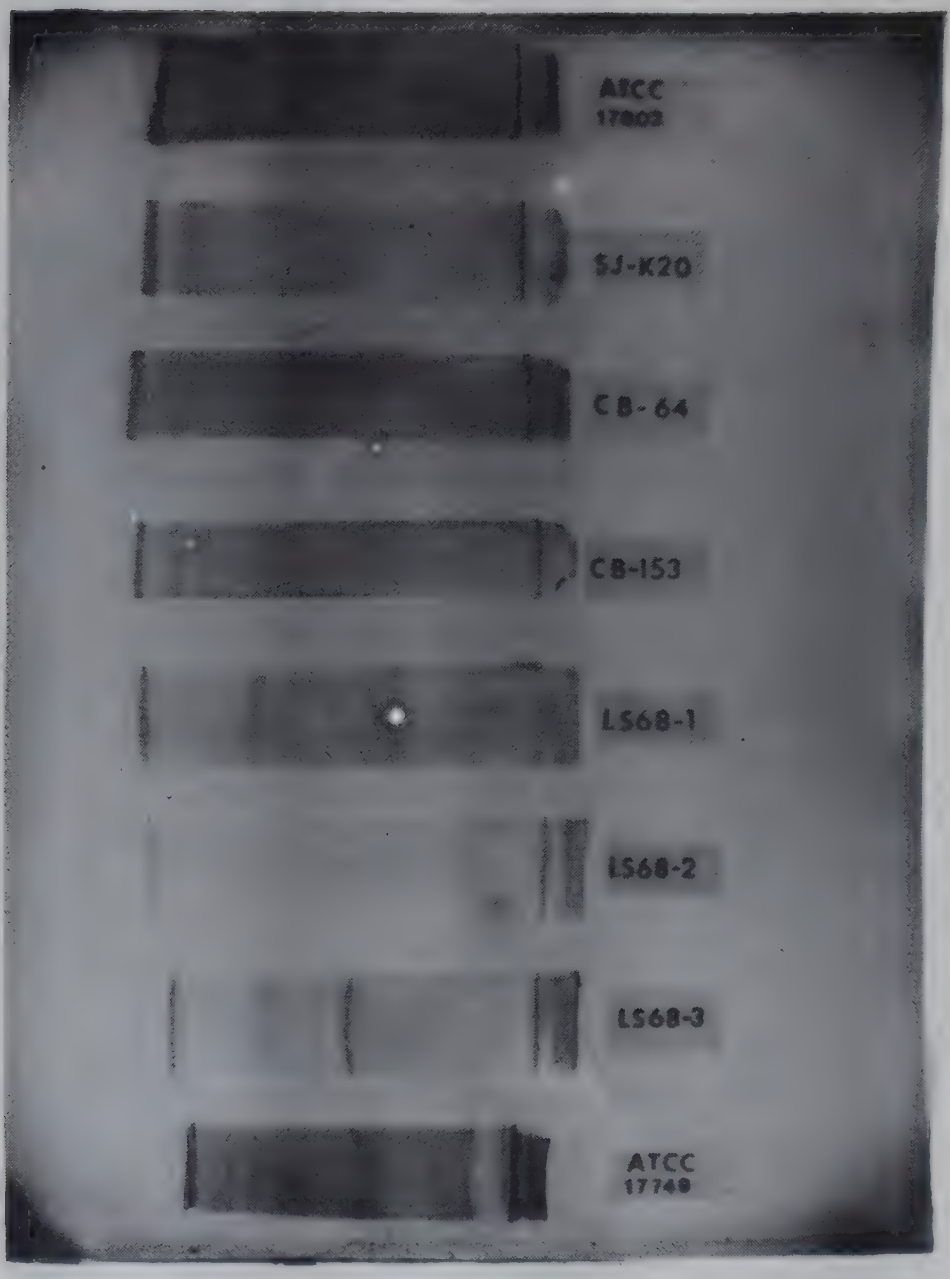


Figura 2. Modelo de proteína total para *V. parahaemolyticus*, *Vibrio* marinho não patogênico (linhagens CB), *V. anguillarum* (linhagens LS) e *V. alginolyticus* ATCC 17749).

O estado metabólico dos microrganismos pode influir no número e tipos de proteínas, que podem ser electroforèticamente separadas. A fim de minimizar essa influência, tôdas as culturas em exame foram cultivadas sob condições culturais essencialmente idênticas. As variações no modêlo de proteína total observadas entre as diferentes espécies de *Vibrio* provàvelmente são diferenças quantitativas e qualitativas entre os ênzimos presentes no sobrenadante.

Testes enzímicos

O Quadro 1 resume os resultados gerais observados nos testes enzímicos.

Lípases

Tween 80 como substrato. Tôdas as linhagens e espécies com reação positiva mostraram a presença de uma banda comum, com a mesma mobilidade electroforética, mas com intensidade variável de reação, que foi muito acentuada em *V. anguillarum* e fraca em *V. alginolyticus*. Um resultado positivo foi observado após incubação dos géis durante 8 horas a 30°C. *V. parahaemolyticus* e linhagens CDC mostraram reações idênticas, caracterizadas pela presença de uma segunda banda, com mobilidade electroforética mais baixa. A figura 3 mostra o modêlo para a reação de lípase.

Gema de ôvo com substrato. *V. parahaemolyticus* e as linhagens patogênicas CDC, mostraram uma reação uniforme, com duas bandas sendo observadas após 2 horas de incubação a 30°C. Essa reação provàvelmente se deve a uma lecitínase, já demonstrada estar presente em *V. parahaemolyticus* (KRANTZ e outros, 1969). A diferenciação do *Vibrio* não patogênico, *V. anguillarum* e *V. alginolyticus* foi baseada na intensidade da reação, que sòmente foi visível após 12 horas de incubação. A Figura 4 mostra o modêlo observado nas reações.

Quadro 1. Atividades características de ênzimos de *V. parahaemolyticus* e vibriões marinhos afins.

Cultura	Tween 80 como substrato	Gema de ovo como substrato	Caseína como substrato	Gelatina como substrato	Amilase	DNase	Hemólise	"Fenômeno de Kanagawa"	Fosfátases Alcalina	Fosfátases Ácida	Estérase aromática
V. parahaemolyticus											
ATCC 17802	+	++	++	+	+	+	+	-	++	++	++
ATCC 17803	+	++	++	+	+	+	+	-	++	++	++
SJ-K4	+	++	++	+	+	+	+	-	+	+	+
SJ-K20	+	++	+	+	+	+	+	-	++	++	++
SJ-K32	+	++	+	+	++	+	+	-	++	++	++
"Suspeito"											
V. parahaemolyticus											
CDC-A1334	+	++	++	++	++	++	+	-	+	+	-
CDC-A3454	+	++	+	+	++	++	+	-	+	+	-
CDC-A8198	+	++	+	++	++	++	+	-	+	+	-
Vibrio marinho											
CB-25	++	+	-	+	-	-	-	-	-	-	++
CB-64	-	+	-	+	++	-	-	-	-	-	++
CB-153	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	++
V. anguillarum											
LS-68-1	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	++
LS-68-2	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-
LS-68-3	+	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-
V. alginolyticus											
ATCC 17749	+	+	-	++	-	+	-	-	-	-	-

++ Reação forte
+ Reação fraca
- Sem reação

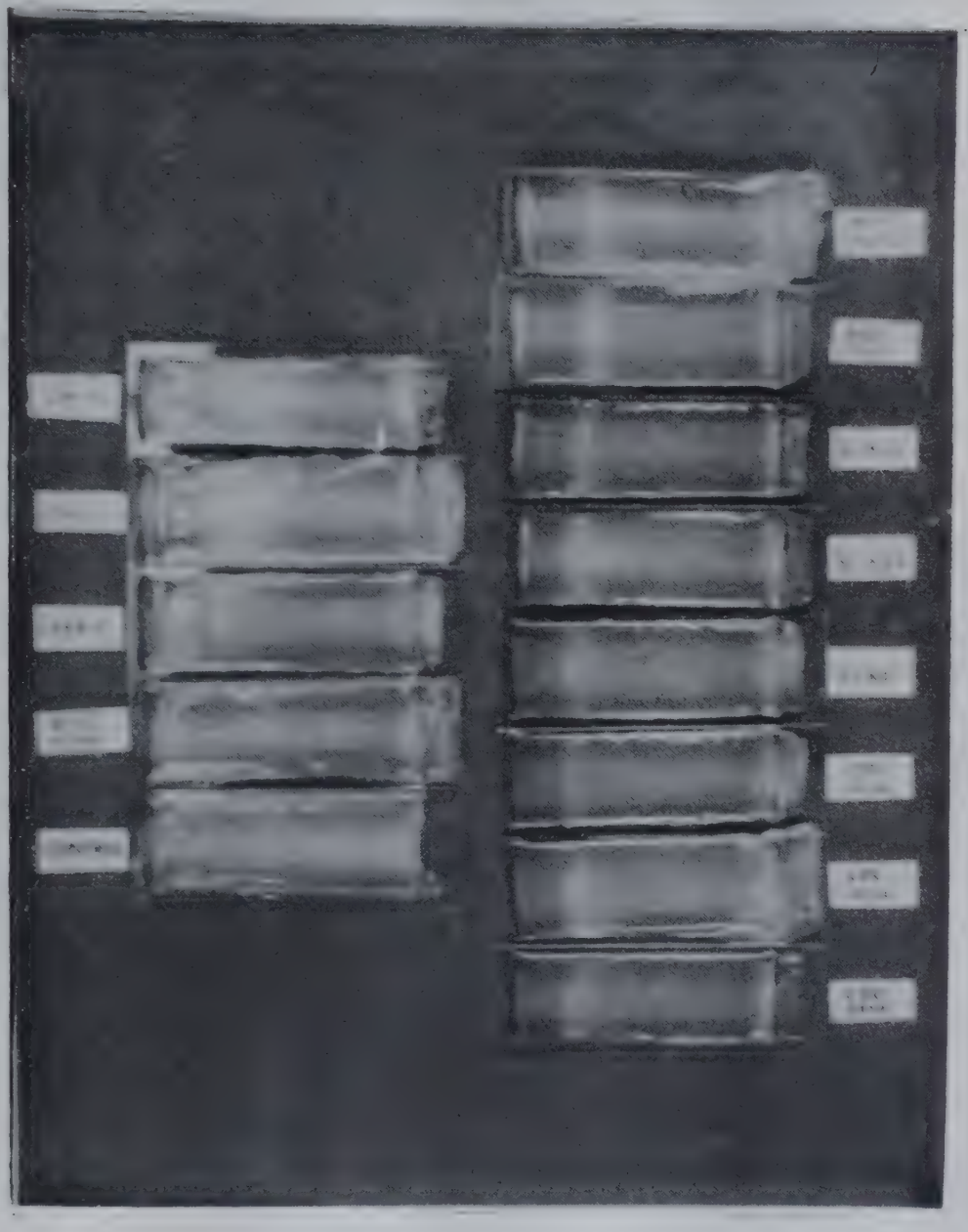


Figura 3. Modelos de reações de lípase, utilizando Tween 80 como substrato, observados após 8 horas de incubação a 30ºC.

Figura 4. Modelos de reações para lípase da gema de ovo, após 12 horas de incubação a 30ºC.

Ênzimos proteolíticos

Um modêlo complexo de formas multimoleculares de ênzimos (isōzimos) foi observado, particularmente ao se utilizar a gelatina como substrato, alguns dos géis mostrando a presença de quatro bandas e, no mínimo, sendo observadas 2 bandas em todos êles. Variações também foram notadas quanto à intensidade das reações, que foram observadas depois de 8 horas de incubação a 30°C.

Quando a caseína era utilizada como substrato, duas bandas foram observadas em *V. parahaemolyticus* e as linhagens de CDC. Entretanto, nenhuma banda era observada nas linhagens não patogênicas ou *V. alginolyticus*. Tôdas as linhagens de *V. anguillarum* mostraram uma reação uniforme, com a presença de duas bandas, mas com mobilidade electroforética mais baixa do que as bandas de *V. parahaemolyticus*. A Figura 5 mostra os resultados observados.

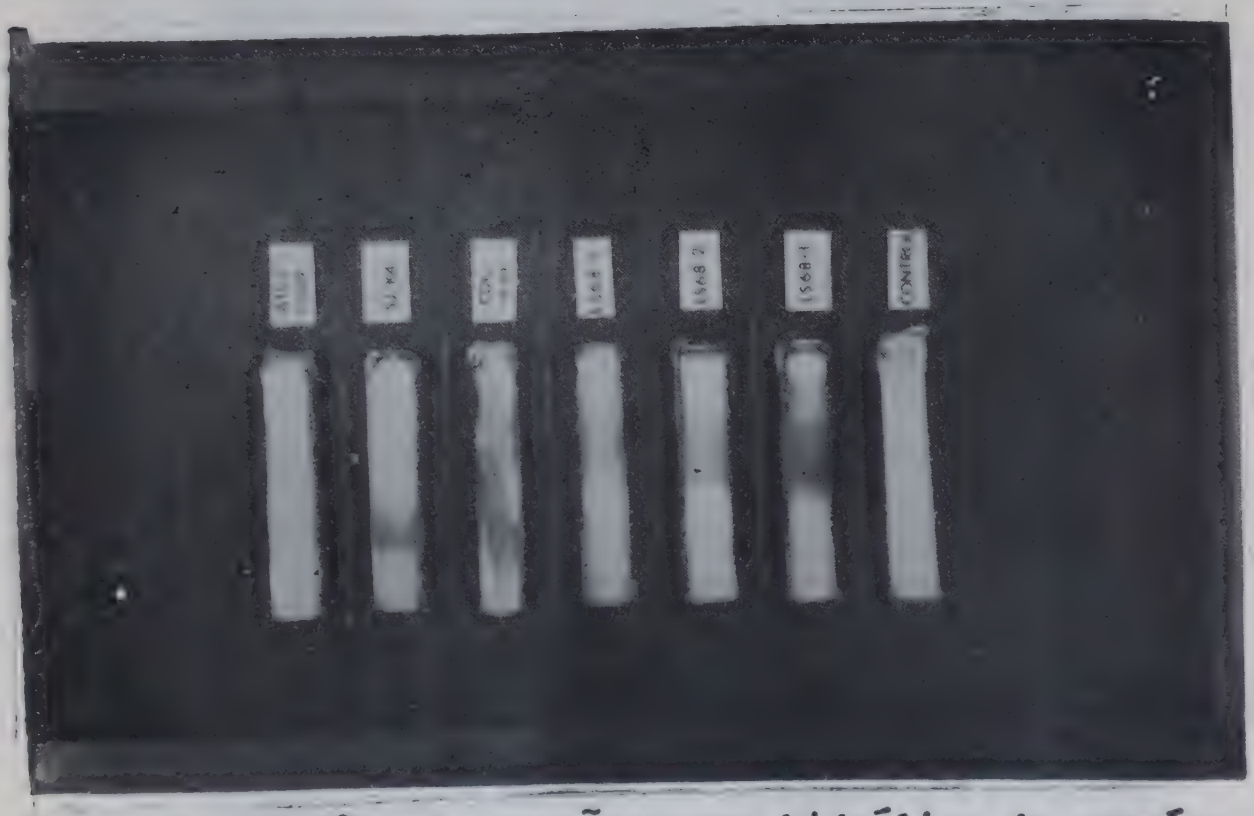


Figura 5. Modêlo de reações para hidrólise de caseína, observadas após a incubação a 30ºC, durante 8 horas.

Quando gelatina foi utilizada como substrato, o modêlo de reação mostrou variações entre linhagens e espécies. Os resultados sugeriram a presença de pelo menos uma banda em comum em *V. parahaemolyticus* e as linhagens patogênicas. *Vibrio* não patogênico (linhagens CB), *V. anguillarum* e *V. alginolyticus* também mostraram uma banda com a mesma mobilidade da banda comum das linhagens patogênicas. A Figura 6 mostra o modêlo observado das reações em algumas das culturas em estudo.

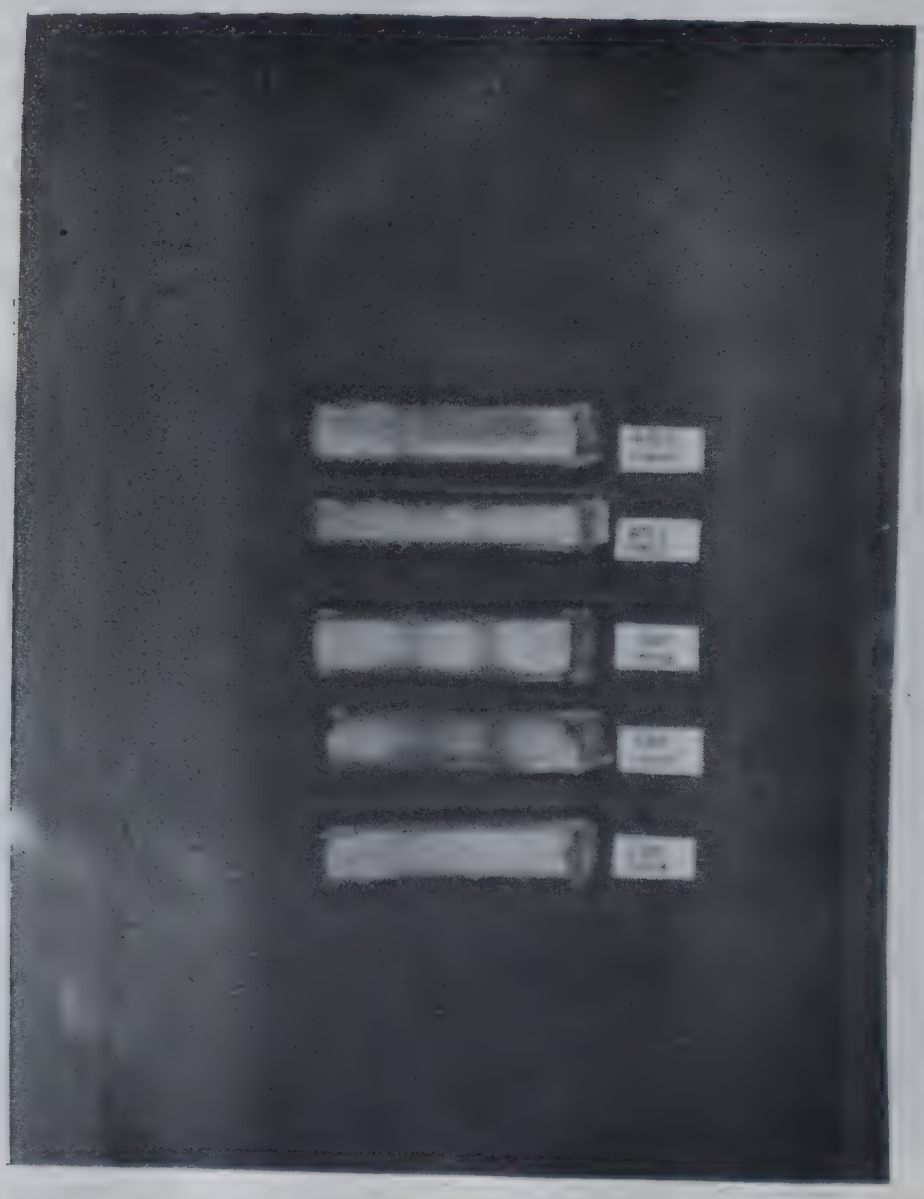


Figura 6. Modêlo de reações para hidrólise de gelatina, observado após incubação a 30ºC durante 8 horas.

Êsses resultados sugerem uma forte atividade proteolítica apresentada pelas culturas de *Vibrio* em exame. A maioria dêsses vibriões marinhos são considerados patógenos ao peixe, particularmente *V. anguillarum*, mas o *V. parahaemolyticus* também foi relatado como agente causal de uma doença em caranguejos azuis. Segundo KRANTS e outros (1969), a presença de lípase, lecitínase e ênzimos proteolíticos pode contribuir para a característica invasiva da bactéria.

Amílase

Uma reação positiva, intensa e uniforme foi observada sòmente em *V. parahaemolyticus* e as linhagens patogênicas (CDC), com a presença de uma banda comum aproximadamente a mesma mobilidade electroforética em todos êles. Sòmente um *Vibrio* marinho (CB 64) não patogênico mostrou uma reação positiva. Os resultados são mostrados na Figura 7.

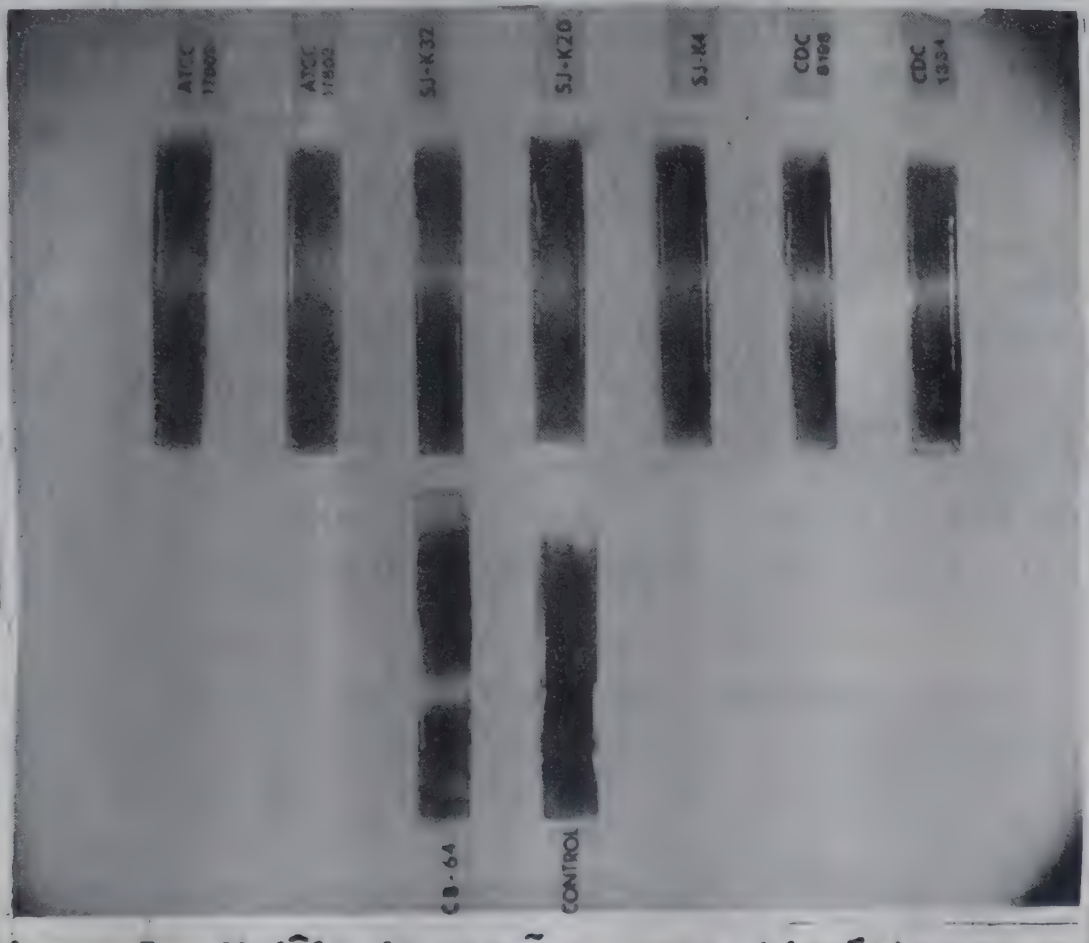


Figura 7. Modêlo de reações para hidrólise de amido, observado após incubação a 30ºC durante 8 horas.

Êsses resultados concordam com as observações feitas por TWEDT e outros (1969), nas quais os autores constataram que pràticamente tôdas as linhagens de origem gastroentérica e de infecção cutânea, foram capazes de hidrolisar o amido, enquanto que 50% aproximadamente de *Vibrio* marinho não patogênico foram incapazes de levar a efeito a hidrólise. Baseados nessa característica, os autores sugeriram que êsse teste devia ser incluído como um critério para separar *Vibrio* marinho patogênico do não patogênico.

Desoxirribonucléase

V. parahaemolyticus e linhagens CDC mostraram atividade de DNase, caracterizada pela presença de uma banda comum, com a mesma mobilidade electroforética em todos êles. A presença de uma segunda banda era visível em algumas das linhagens (ATCC 17802, ATCC 17803 e SJ-K32). Todos os *Vibrio* marinhos não patogênicos e *V. anguillarum* mostraram uma reação negativa, mas *V. alginolyticus* também apresentou atividade DNase. A figura 8 mostra os resultados observados.

Segundo Brock (1970, p. 137) há um número de microrganismos que podem utilizar os ácidos nucléicos como fontes de carbono, nitrogênio e energia. Os ácidos nucléicos são hidrolisados a nucleótides por nucléases, que são ênzimos extracelulares. Isso torna possível ao organismo utilizar ácidos nucléicos de elevado pêso molecular, que não podem passar através de membrana celular, mas os produtos de hidrólise de nucleótides, de baixo pêso molecular, penetram nas células.

Alta produção de DNase é observada em bactérias piogênicas dos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Nas pústulas ou furúnculos, onde êsses organismos crescem, há uma grande destruição de tecido, e, através da produção de nucléases, essas bactérias são capazes de usar como nutrientes os ácidos nucléicos liberados das células mortas. Similarmente, algumas linhagens (CDC) "suspeitas" de *V. parahaemolyticus*

foram isoladas de infecções da pele e de tecidos, sendo cultivadas a partir da secreção de olhos e ouvidos, lesões de pernas, pés, etc. (TWEDT e outros, 1969). Êsse fato sugere uma explicação possível para a presença da atividade DNase nessas linhagens.

Hemólise

Uma reação positiva foi observada sòmente em *V. parahaemolyticus* e as linhagens patogênicas, com duas bandas uniformes sendo formadas, com mobilidades relativas (comparadas com a mobilidade do corante de rastreio) 0,68 e 0,88. Entretanto, a intensidade da ração foi muito fraca, sendo observada sòmente após incubar a 30°C durante 12 horas.

Os resultados negativos observados em *Vibrio* marinho não patogênico (linhagens CB), não significam que sob diferentes condições essas linhagens não possam apresentar atividade hemolítica. TWEDT e outros (1969) relataram que 12 das 14 linhagens não patogênicas estudadas produziam hemólise quando as culturas eram estriadas em Brain Heart Infusion Agar, contendo 5% de sangue de carneiro.

Uma explicação possível, para as diferenças entre linhagens patogênicas e não patogênicas, podia ser a variação na concentração do fator hemolítico presente em maiores quantidades nos sobrenadantes das linhagens patogênicas. *V. anguillarum* não é relatado como apresentando atividade hemolítica, segundo SMITH (1961), que o testou em ágar-sangue de cavalo, e CISAR e FRYER (1961) que observaram resultados negativos quando testando em ágar-sangue de carneiro. De acôrdo com MIYAMOTO e outros (1961), *Vibrio alginolyticus* mostrou uma fraca atividade hemolítica, quando cultivado em ágar-sangue com 3% de NaCl.

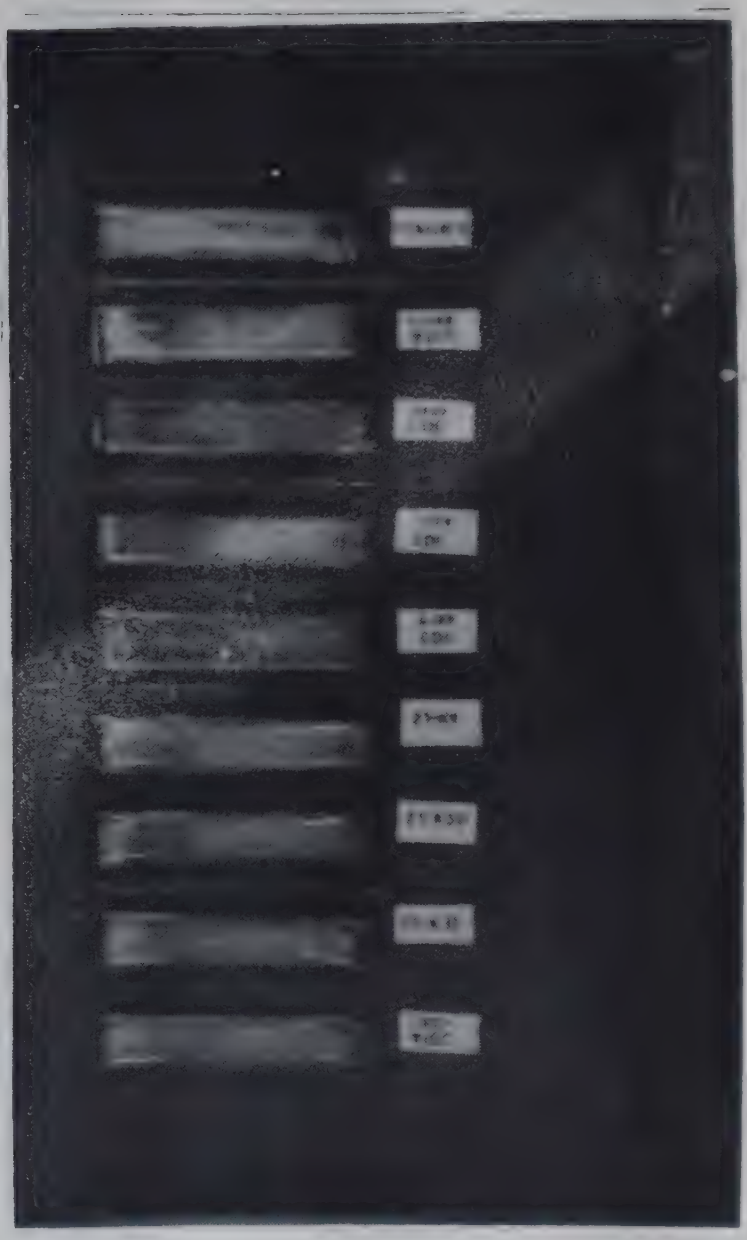


Figura 8. Atividade de DNase, observada após incubação a 30ºC, durante 8 horas.

"Fenômeno de Kanagawa"

Todos os sobrenadantes concentrados falharam em mostrar a presença do fator hemolítico responsável pelo "fenômeno de Kanagawa". SAKAZAKI e outros (1968) e MIYAMOTO e outros (1969) relataram que êsse fator está presente apenas nas linhagens patogênicas, sendo termoestável e demonstrável nos sobrenadantes. Nenhuma relação foi encontrada entre as propriedades bioquímicas e sorológicas e a atividade hemolítica dos vibriões. De acordo com THATCHER e CLARK (1968, p. 108), a atividade hemolítica é relatada como decrescendo após passagens sucessivas das linhagens hemolíticas em meio de cultura artificial, o que, provàvelmente, explicaria a reação negativa observada.

Fosfátases

Fosfátase alcalina. Uma reação positiva, visível 20' após a imersão dos géis na solução contendo o substrato, foi observada em *V. parahaemolyticus* e linhagens CDC e uma das linhagens não patogênicas (CB-135). O modêlo mostrou a presença de pelo menos uma banda comum entre tôdas as linhagens positivas, com uma mobilidade relativa de 0,66, enquanto que uma segunda banda, com menor mobilidade electroforética, era observada nas linhagens ATCC 17803, SJ-K32 e SJ-K20.

Fosfátase ácida. O modêlo de reações foi semelhante a fosfatase alcalina, sendo observada uma ligeira variação nas mobilidades electroforéticas. Novamente, todos *V. parahaemolyticus* e linhagens CDC mostraram uma reação positiva, e uma banda comum com uma mobilidade relativa de 0,64 foi observada em todos êles, exceto na linhagem ATCC 17802; essa linhagem mostrou uma banda comum com ATCC 17803 e uma mobilidade relativa de 0,57. Finalmente, uma terceira banda, com menor mobilidade e mais fraca intensidade, foi observada em quatro linhagens. A Figura 9 mostra o modêlo para a fosfátase ácida.

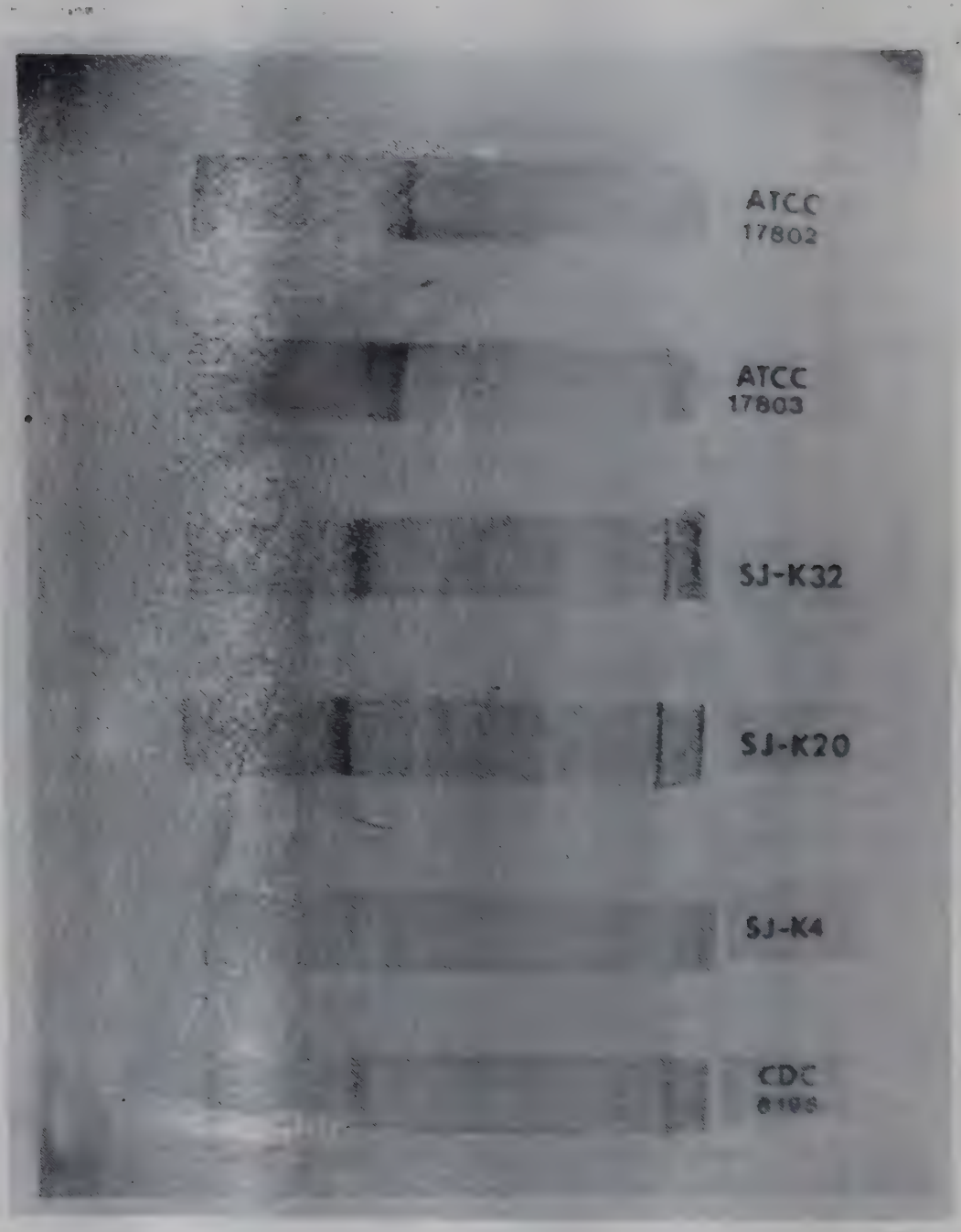


Figura 9. Modêlo para fosfátase ácida, observado após incubação durante 1 hora a 30ºC.

Estérases aromáticas

Êste foi o único teste em que foi observada uma diferença entre as linhagens de *V. parahaemolyticus* de origem gastroentérica e os isolados de infecções cutâneas "suspeitos" *V. parahaemolyticus*. As linhagens ATCC e SJ mostraram um modêlo com a presença de três bandas com aproximadamente as mesmas mobilidades electroforéticas (0,60, 0,72 e 0,78). As linhagens não patogênicas (CB) e *V. anguillarum* LS-68-1 mostraram a presença de uma única banda, tendo a mesma mobilidade que a banda menos móvel das linhagens de *V. parahaemolyticus* (0,60). As linhagens patogênicas (CDC) mostraram um resultado negativo. A Figura 10 mostra os resultados observados.

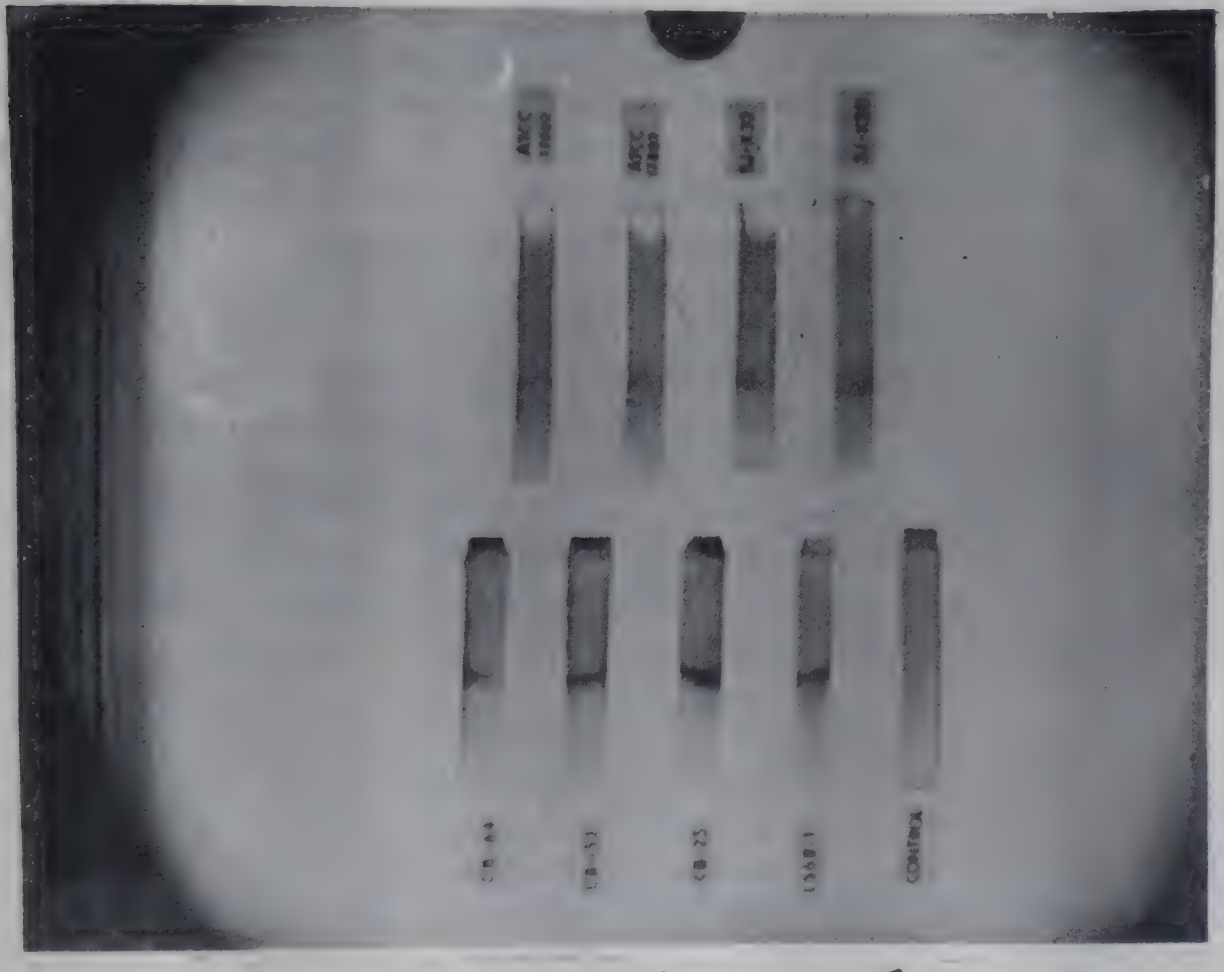


Figura 10. Modêlo para estérases aromáticas, observado após incubação a 30ºC, durante 1 hora.

O modêlo de estérase tem sido considerado de valor na caracterização dos microrganismos (LUND, 1965; ROBINSON, 1968; ADEYEMO e outros, 1967; COLWELL e outros, 1968). ADEYEMO e outros (1967) observaram a presença de um modêlo de estérase em *V. cholerae* e *Vibrio* sp., afim, caracterizado pela presença de uma, duas ou três bandas, a última sendo observada em linhagens variadas e vibriões não coleragênicos. COLWELL e outros (1968) observaram a presença de uma única banda de estérase entre 12 linhagens de *V. parahaemolyticus*. Entretanto, êsses experimentos foram executados sob condições diferentes, utilizando eletroforese em gel de amido, a partir de extratos preparados de células rompidas e, conseqüentemente, os resultados não são diretamente comparáveis.

Discussão de testes selecionados

Os resultados gerais obtidos nesse experimento, sugerem uma grande semelhança entre *V. parahaemolyticus* e as linhagens patogênicas CDC, independente do local e das condições do isolamento original. Mesmo considerando algumas variações, observadas particularmente na reação para estérase aromática, o modêlo para todos os outros testes foi idêntico ou muito similar. Os *Vibrio* marinhos não patogênicos (linhagens CB), *V. anguillarum* e *V. alginolyticus* mostraram uma grande variação quando comparados com o *V. parahaemolyticus* e foi obtida uma clara diferenciação. Entretanto, as culturas não patogênicas mostraram um modêlo semelhante na maioria das reações.

TEWDT e outros (1969) estudando as características culturais, morfológicas e fisiológicas de culturas em crescimento de *V. parahaemolyticus* e *Vibrio* marinho não patogênico, também concluíram que êsses dois grupos podiam ser distinguidos nos aspectos culturais e bioquímicos.

Os resultados obtidos no presente experimento sugerem um rápido caminho para diferenciar potencialmente as linhagens patogênicas de *V. parahaemolyticus*.

Os testes de DNase, fosfátase, amílase e lípase de gema de ôvo, mostraram os resultados mais característicos para a diferenciação. Os outros testes não pareceram tão satisfatórios, particularmente devido às variações no modêlo das reações entre as linhagens patogênicas (como no caso da estêrase aromática), reações idênticas em tôdas as culturas, como ligeira variação na intensidade (lípase, utilizando Tween 80 como substrato), modelos muito complexos, com a presença de diversas bandas com variações nas mobilidades electroforéticas (hidrólises de gelatina e caseína) ou intensidade muito fraca da reação, tornando a observação correta difícil e imprecisa (hemólise).

O teste para a presença da fosfátase é comumente empregado na caracterização de estafilococos potencialmente patogênicos, e é também considerado como um critério valioso para a diferenciação e separação dos organismos dentro dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus*. O teste da atividade de DNase também é considerado de valor, a fim de detectar estafilococos patogênicos e o meio diferencial é disponível comercialmente, baseado na suposição de que há uma estreita correlação entre nucléase estafilocócica e a produção de enteroxina.

Êsses Êsses fatos sugerem a possibilidade da formulação de meio diferencial, a fim de caracterizar as linhagens potencialmente patogênicas de *V. parahaemolyticus*. Embora as observações feitas nesse estudo sejam válidas para as condições do experimento, isso não significa que um comportamento semelhante será observado em outras situações. Se estudos futuros, com um maior número de linhagens e com culturas em crescimento confirmarem essas características, êsses testes poderão ser empregados para uma identificação mais rápida.

O emprêgo da electroforese de gel parece ser de valor para a taxonomia de *Vibrio*, confirmando observações prévias feitas por outros autores. O emprêgo de sobrenadantes de culturas, concentrados, ao

invés de extratos preparados de células rompidas, tem as vantagens de consumir menos tempo na preparação, ser relativamente fácil para execução e com reduzida possibilidade de contaminação, uma limitação sendo que pràticamente apenas ênzimos extracelulares presentes nos sobrenadantes podem ser estudados.

Experimento II

Resistência térmica de *Vibrio parahaemolyticus*

Material e Métodos

Cultura

A bactéria estudada foi o *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 (Typestrain). A cultura primária foi mantida em tubos inclinados, contendo Trypticase Soy Agar (BBL) mais 2,5% de NaCl, e coberto com uma camada de óleo mineral estéril e incubada à temperatura ambiente.

Preparo dos inóculos

Da cultura primária, um inóculo era transferido para tubos inclinados do Meio de Manutenção de *Vibrio*. Após incubação a 37°C durante 24 horas, as células eram lavadas da superfície do ágar inclinado com água peptona e sal (1% peptona, 2,5% de NaCl e pH ajustado para 7,2) agitando-se bem com pérolas de vidro para desfazer os grumos, e ajustando-se à concentração desejada por meio de um espectrofotômetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb). Empregou-se, como fonte de inóculo, uma suspensão contendo aproximadamente 10^8 células/ml.

Em cada experimento, as células empregadas como inóculo, eram obtidas de uma cultura secundária de 24 horas, sofrendo apenas uma única transferência a partir da cultura primária. Essa técnica foi empregada

para minimizar a variação e a seleção inadvertida de tipos cuja resistência térmica diferisse daquela da linhagem original.

Técnica experimental

O experimento foi conduzido empregando-se o método de frasco, de acôrdo com o procedimento recomentado por STUMBO (1965, p. 83). Foram empregados frascos de três gargalos (garrafa de Woulff) de 500 ml como recipientes. Um termômetro foi introduzido através de um gargalo, um agitador mecânico através do gargalo central e o terceiro gargalo sendo utilizado para introdução do inóculo e a retirada de amostras.

O meio de cultura empregado no experimento foi de água, sal e peptona, cuja composição já foi mencionada. Após a introdução do meio de cultura, o conjunto todo foi esterilizado durante 15' a 121°C.O frasco, contendo 300 ml do meio de suspensão, foi resfriado e imerso num banho de água, controlado termostàticamente à temperatura desejada. O conjunto foi colocado no banho, de modo que a superfície do meio de aquecimento ficasse bem acima da superfície do substrato no frasco, tendo-se tomado cuidado especial para evitar borrifos do substrato nas paredes do fresco. Quando se atingia o equilíbrio entre as temperaturas do banho de água e do meio de cultura, adicionava-se ao frasco 1 ml da suspensão do inóculo (dando uma concentração de células final de aproximadamente 10^5 células por ml). As contagens foram feitas no tempo zero, a fim de se determinar, com maior precisão, o número inicial de células. A vários intervalos de tempo, amostras de 1 ml eram retiradas com uma pipeta e transferidas para tubos esterilizados vazios, num banho de água fria. Diluições apropriadas eram feitas com água destilada mais 2,5% NaCl e plaqueadas em meio de manutenção do *Vibrio* como meio de recuperação. As placas eram incubadas a 37°C e as contagens feitas após 24 e 48 horas, determinando-se o número de sobreviventes. O experimento foi conduzido às temperaturas de 113° (45°C), 118,4°F (48°C e 122°F (50°C).

Influência da natureza do meio de subcultura

A fim de se observar a influência da natureza do meio de recuperação sôbre a curva de sobreviventes da bactéria, três meios de recuperação foram empregados: Brain Heart Infusion Agar mais 2,5% de NaCl, Trypticase Soy Agar mais 2,5% de NaCl e Meio de Manutenção de *Vibrio*. O mesmo procedimento, como já descrito, foi seguido, mas o experimento foi levado a efeito sòmente à temperatura de 50°C.

Tratamento dos dados

O "valor D" foi o parâmetro empregado para expressar a resistência térmica aparente da bactéria. A cada temperatura e repetição, o declive da curva de sobreviventes foi determinado pelo método de regressão. A recíproca do coeficiente de regressão obtido foi usada como o "valor D" nas condições particulares da linhagem da bactéria, meio de teste e temperatura, sendo ignorado o sinal negativo do coeficiente de regressão (THOMAS, WHITE e LONGREE, 1966).

Desde que é assumida a ordem logarítmica de morte, o "valor D" também pode ser calculado a partir do número inicial de células ou esporos, e o número sobrevivente após um dado tempo de aquecimento a cada temperatura. (STUMBO, 1965, p. 92; NCA, 1968, p. 190).

$$D = \frac{U}{\log a - \log b}$$

em que:

U = tempo de aquecimento em minutos
a = nº inicial de microrganismos
b = nº de microrganismos que sobreviveu ao tempo de aquecimento (U).

Êsse método também foi aplicado, a fim de determinar o "valor D". As variações na curva de

sobreviventes e, conseqüentemente, em "valor D", segundo a natureza do meio de recuperação, foram determinadas por análise estatística de variância entre os "valores D", obtidos em diferentes meios de cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resistência Térmica a Diferentes TEMPERATURAS

O Quadro 2 resume os resultados obtidos quando *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 foi aquecido a diferentes temperaturas.

Quadro 2. "Valor D" para *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, a três temperaturas.

Temperatura	"Valor D" fórmula (min)	"Valor D" regressão (min)	Coeficiente de correlação
113°F	43,9	42,5	0,994 (**)
	35,0	32,2	0,999 (**)
Média	39,0	40,0	0,972 (*)
118,4°F	1,92	1,83	0,994 (**)
	2,13	2,30	0,976 (**)
	1,82	1,92	0,972 (*)
Média	1,95	2,01	
122°F	0,49	0,49	0,993 (*)
	0,51	0,49	0,990 (**)
	0,53	0,54	0,970 (*)
Média	0,51	0,50	

(*) Significante ao nível de 5%.
(**) Significante ao nível de 1%.

As Figuras 11, 12 e 13, mostram as características da curva de sobreviventes obtida pela locação em papel semi-logarítmico do número de sobreviventes relacionados ao tempo de exposição, sendo o declive determinado por regressão.

Os valores "D", determinados pelo método de regressão foram muito semelhantes aos obtidos pelo método da fórmula. De acôrdo com THOMAS e outros (1966), o método de regressão, embora sendo mais trabalhoso, tem a vantagem de utilizar tôda a informação obtida em cada experimento.

Os resultados sugerem uma resistência térmica muito baixa para *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. Observações feitas por outros autores, sob diferentes condições, confirmam parcialmente essa característica nos microrganismos do gênero *Vibrio* e, particularmente, para *V. parahaemolyticus*. Entretanto, nenhuma generalização pode ser feita sôbre a resistência térmica dessa bactéria, baseada no presente experimento, porque variações na linhagem estudada e na composição do meio de suspensão, resultariam, provàvelmente, numa resistência térmica aparente diferente.

O uso de tampão fosfato, como meio de suspensão padrão, não é indicado no caso de *V. parahaemolyticus*. Essa bactéria é relatada como sendo destruída quando suspensa em água destilada (TENMYO, 1966). THATCHER e CLARK (1968, p. 109) recomendaram o uso de 4% de sal em caldo de peptona como líquido de diluição, ao invés de tampão fosfato, enquanto que outros autores recomendam água de diluição com 3% de NaCl (USPHS, FDA, 1969, Sec. BAM 14.06).

Influência no meio de recuperação na resistência térmica aparente

O Quadro 3 mostra as variações nos "valores D", de acôrdo com a composição do meio de recuperação.

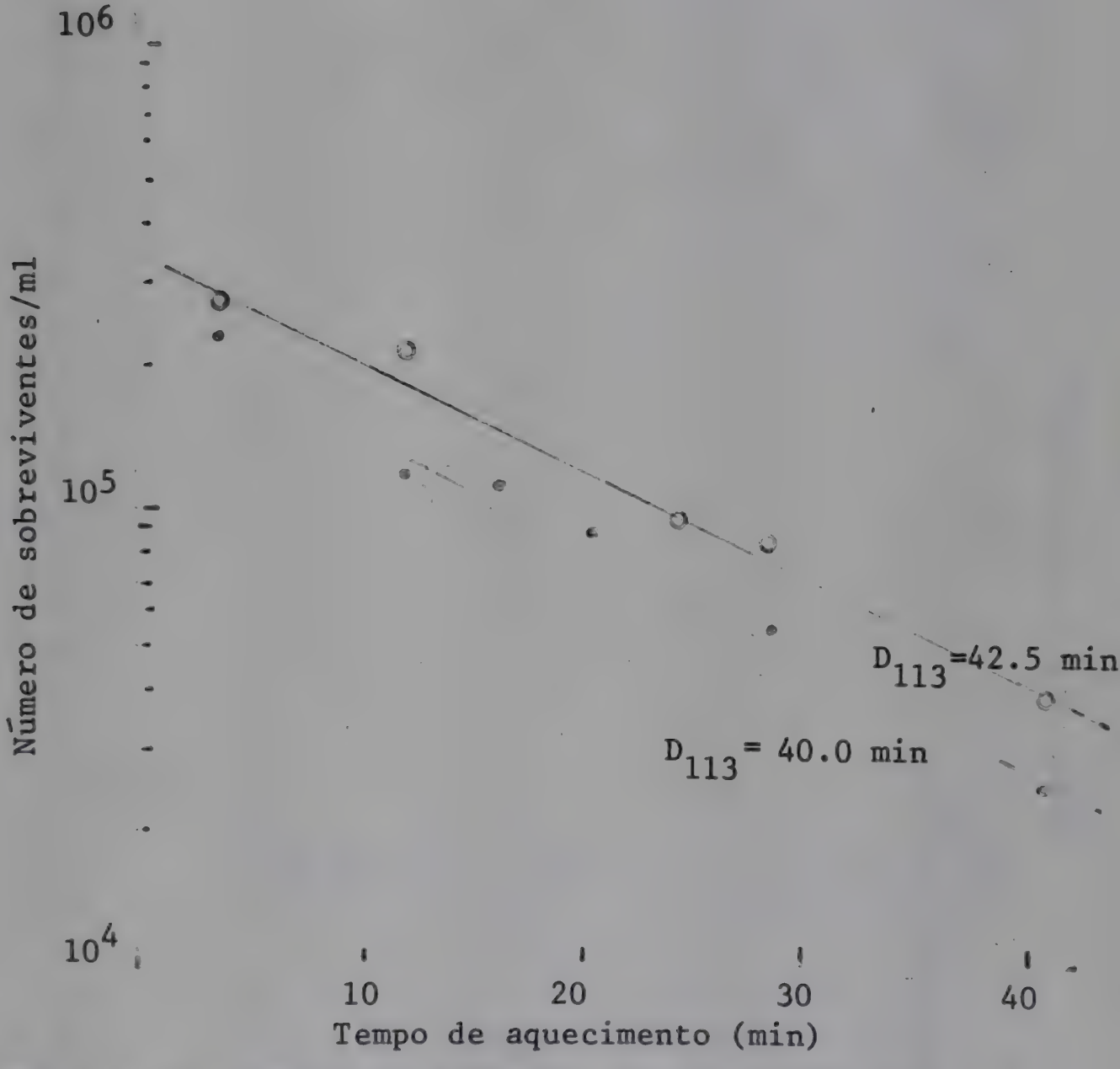


Figura 11. Curva logarítmica de sobreviventes de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, à temperatura de 45°C.

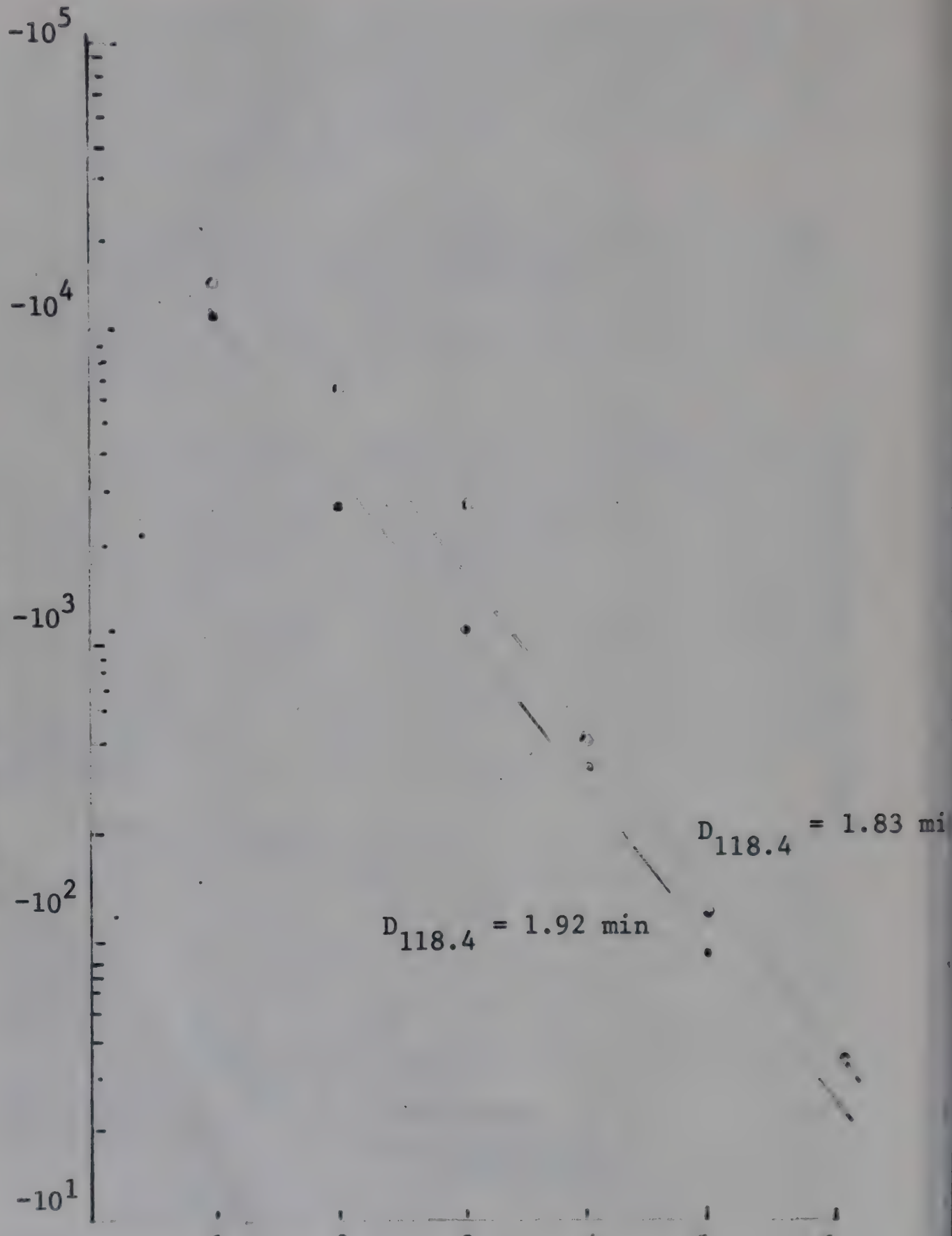


Figura 12. Curva logarítmica de sobreviventes de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, à temperatura de 48°C.

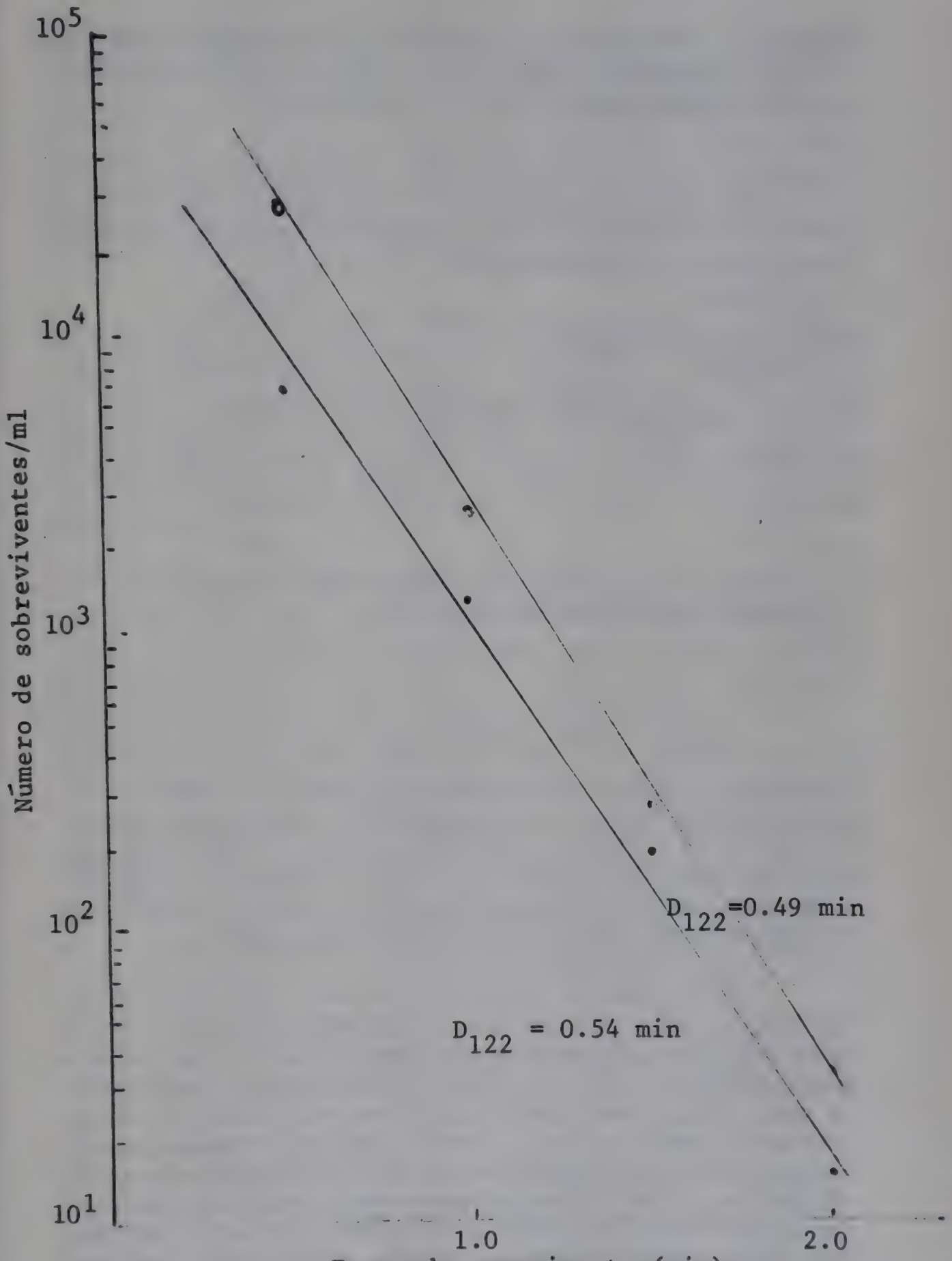


Figura 13. Curva logarítmica de sobreviventes de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, à temperatura de 50°C.

Quadro 3. Variações na resistência térmica aparente de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 a 50°C, de acôrdo com a composição do meio de recuperação.

Meio de recuperação	Resultado valor D_{122}
"Brain Heart Infusion Agar" + 2,5% NaCl	0,285
"Trypticase Soy Agar" + + 2,5% NaCl	0,230
Meio de manutenção de *Vibrio*	0,500
Variância, F	39,03 (*)
$LSD_{.05}$	0,137
$LSD_{.01}$	0,316

(*) Significativo ao nível de 5%.
LSD =

Os resultados sugerem que o Meio de Manutenção de *Vibrio*, no qual "valores D" mais altos foram observados, deve ser considerado o meio de recuperação mais adequado para ser empregado em estudos de resistência térmica de *V. parahaemolyticus*. Uma diferença significativa ao nível de 5% foi observada, quando comparado com os outros dois meios, sem haver diferença significativa entre os dois últimos meios.

Desde que a célula bacteriana que falha em se reproduzir sob condições consideradas favoráveis para essa atividade, é geralmente considerada como célula morta (STUMBO, 1965, p. 68), é importante selecionar um meio para contagem de células aquecidas que dê as contagens mais altas. Isto é particularmente importante quando se considera bactérias deterioradoras de alimentos e bactérias patogênicas, porque uma avaliação incorreta da resistência térmica poderá resultar num processamento térmico menos severo, com maiores

probabilidades de sobrevivência dêsses microrganismos. Freqüentemente, os vários tipos de meios podem dar resultados de crescimento que sejam equivalentes para células não aquecidas, mas com resultados diferentes, quando se comparam os sobreviventes de um tratamento térmico. As células bacterianas, danificadas pelo processo térmico, geralmente são mais lentas no crescimento e mais exigentes de nutrientes.

Êsses aspectos foram ressaltados no presente experimento. Trypticase Soy Agar mais 2,5% de NaCl e Brain Heart Infusion Agar mais 2,5% de NaCl, são os meios comumente empregados na manutenção de *V. parahaemolyticus*, sendo observado um intenso crescimento. Entretanto, após o tratamento térmico, êsses dois meios não foram satisfatórios para a recuperação das células.

Diversas explicações possíveis para o efeito do calor nas células vegetativas foram apresentadas (ORDAL 1970), mas é difícil relacionar essas mudanças com a presença de substâncias no meio de recuperação que contribuirão para reparar as estruturas e funções celulares.

O meio de Manutenção de *Vibrio* é caracterizado pela presença de sais minerais (NaCl, KCl, $MgCl_2$, $MgSO_4.7H_2O$), além da adição de extrato de levedura e, de acôrdo com TWEDT e outros (1969), é o meio preferido para *Vibrio* marinho de crescimento lento. Provavèlmente, a presença dêsses componentes está relacionada com a melhor recuperação das células danificadas pelo calor.

Do ponto-de-vista prático, a determinação do valor D está relacionada a dois fatôres importantes: 1) que as chances de sobrevivência na população microbiana sujeitas ao calor são mais baixas quanto menor a densidade da população. Portanto, é necessário, de um ponto-de-vista industrial conservar o número de microrganismos ao nível mais baixo possível. 2) que é teòricamente impossível atingir a esterilização completa, porquanto a curva de sobrevivência é logarítmica, ten-

dendo assintõticamente para zero. Portanto, é apropriado falar de esterilização prática ou "esterilização comercial", sem significar que a esterilização absoluta tenha sido atingida.

LITERATURA

1. ADEYEMO, V. I., ELLINGSEN, N.H. & COLWELL, R. R. Electrophoretic analysis in bacterial taxonomy. Esterase systems in *Vibrio cholerae* and related *Vibrio* sp. Developments in Industrial Microbiology 8: 187-197, 1967.

2. BAROSS, J. & LISTON, J. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from the Northwest Pacifc. Nature 217: 1263-1264, 1968.

3. BROCK, T.D. Biology of microrganisms. Englewood Cliffs, N.J., Prentice-Hall, INc. 737 p., 1970.

4. BRYAN, F. L. New concepts in foodborne illness. Journal of Environmental Health 31:327-337,1969.

5. BURROWS, W. et al. Texbook of Microbiology. 19th ed. Philadelphia, Pa., W.B. Saunders Company, 974 p., 1968.

6. BURSTONE, M.S. Enzyme histochemistry New York, Academic Press, 312 p., 1962.

7. CISAR, J. O. & FRYER, J. L. An epizootic of vibriosis in chinook salmon. Bulletin Wildlife Disease Association 5: 73-76.

8. COLWELL, R.R. ADEYEMO; V.I. & KIRTLAND, H. H. Esterases and DNA base composition analysis of *Vibrio cholerae* and related vibrios. Journal of Applied Bacteriology 31: 323-335, 1968.

9. DACK, G.M. Importance of foodborne disease outbreaks of unrecognized causes. Food Technology 20: 1279-1284, 1966.

10. DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Annals of the New York Academy os Sciences 121:404-427, 1964.

11. DONNELLY, C.B.et al. Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. Applied Microbiology 15: 1382-1387, 1967.

12. FUJINO, T. (Ed.) *Vibrio parahaemolyticus*. Tokyo, Isseido Publishing Company, 422 p., 1964.

13. HORIE, S., SAHEKI, K. & OKUZUMI, M. Quantitative enumeration of *V. parahaemolyticus* in sea and estuarine waters. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 33:126-130,1967.

14. KRANTZ, G.E., COLWELL, R.R. & LOVELACE, E. *Vibrio parahaemolyticus* from the blue crab *Callinectes sapidus* in Chesapeake Bay. Science 164:1286-1287, 1969.

15. LEVANT, E. M. In vitro identification of *Clostridium botulinum* by means of extracellular enzyme tests. Doctoral dissertation Corvallis,Oregon State University. 73 numb. leaves, 1969.

16. LUND, B. M. A comparison by the use of gel electrophoresis of soluble protein components and esterase enzymes of some group D streptocicci. Journal of General Microbiology 40: 413-419,1965.

17. MARKERT, C.L. & MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue,ontogenetic and species specific pattern. Proceedings of the National Academy of Scientes 45: 753-763, 1959.

18. MIYAMOTO, Y., NAKAMUMA, K. & TAKAZAWA, K. Pathogenic halophiles. Proposals of a new genus *"Oceanomonas"* and of the amended species names. Japanese Journal of Microbiology 5:477-486, 1961.

19. _____ et al. In vitro hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*:its close correlation with human pathogenicity. Journal of Bacteriology 100:1147-1149, 1969.

20. NATIONAL CANNERS ASSOCIATION RESEARCH LABORATORIES. Laboratory manual for food canners and processors. Vol. I, Microbiology and processing. Westport, Connecticut, the AVI Publinshing Company, Inc. 336 p., 1968.

21. NORRIS, J.R. The classification of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Applied Bacteriology 27: 439-447, 1964.

22. ORDAL, Z.J. Current developments in detection of microorganisms in foods: influence of envi - ronmental factors on detection methods. Journal of Milk and Food Technology 33: 1-5, 1970.

23. ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. Annals of the New York Academy of Sciences 121:321-349, 1964.

24. RIEMANN, H. Food processing and preservation effects. In: Food borne infections and intoxications, ed. by H.Riemann, New York, Academic Press. p. 489-541, 1969.

25. ROBINSON, K. The use of cell wall analysis and gel electrophoresis for the identification of coryneform bacteria. In: Identirication methods for microbiologists, part B, ed. by B.M. Gibbs and D.A. Shapton, London, Academic Press p. 85-92, 1968.

26. SAKAZAKI, R, IWANAMI, S. & FUJUMI, H. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. *I*. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomic position. Japanese Journal of Medical Science and Biology 16: 161-188, 1963.

27. _____. *Vibrio parahaemolyticus* a noncholerageni enteropathogenic vibrio. In: Proceedings of the Cholera Research Symposium, Jan. 24.-29, 1965, Honolulu, Hawaii, Washington, D.C. p. 30-34. (U.S. Public Health Service, Publication no. 1328), 1965.

28. _____. Proposal of *Vibrio alginolyticus* for the biotype 2 of *Vibrio parahaemolyticus*, Japanese Journal of Medical Science and Biology 21:359-362, 1968.

29. _____, IWANAMI, S & TAMURA, K. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. II. Serological characteristics. Japanese Journal of Medical Science and Biology 21:313-324,1968a.

30. _____ et al. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. III. Enteropathogenicity. Japanese Journal of Medical Science and Biology 21: 325-331, 1968b.

31. _____. Halophilic vibrio infections. In:Food borne infections and intoxications, ed. by Hans Riemann, New York Academic Press. p. 115-129, 1969.

32. SCHMIDT, C. F. Thermal resistance of microrganisms. In: Antiseptics, disinfectants, fungicides, and chemical and physical sterilization ed. by G. F. Reddish, Philadelphia, Pa., Lea and Fabiger, p. 720-759, 1954.

33. SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek 23: 15-22, 1956.

34. SMITH, I.W. A disease of finnock due to *Vibrio anguillarum*. Journal of General Microbiology 24: 247-252, 1961.

35. STUMBO, C.R. Thermobacteriology in food processing. New York, Academic Press, 236 p., 1965.

36. TENMYO, R. Studies on the prevention of outbreaks of food poisoning caused by *V. parahaemolyticus*. Tokyo Medical Dental University Bulletin 13: 489-510. (Abstracted in Biological Abstracts 49: nº 20326), 1966.

37. THATCHER, F. S. & CLARK, D.S. (eds.) Microorganisms in foods: their significance and method of enumeration. Toronto, Canadá, University of Toronto Press. 234 p., 1968.

38. THOMAS, C.T., WHITE, J. C. & LONGREE, K. Thermal resistance of *Salmonellae* and *Staphylococci* in foods. Applied Microbiology 14: 815-820, 1966.

39. TWEDT, R. M., SPAULDING, P.L. & HALL, H.E. Morphological, cultural, biochemical and serological comparison of Japanese strains of *Vibrio parahaemolyticus* with related cultures isolated in the United States. Journal of Bacteriology 98: 511-518, 1969.

40. UNITED STATES PUBLIC HEALTH SERVICE. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. 2d. ed. Washington, D.C. Various paging.

41. WARD, B.Q. Isolation of organisms related to *Vibrio parahaemolyticus* from American estuarine sediments. Applied Microbiology 16:543 - 546, 1968.

42. ZEN YOJI, H. et al. Epidemiology, enteropathogenicity, and classification of *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Infectious Diseases 115: 436-444, 1965.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/1970

CURVA DE SATURAÇÃO DO FEIJÃO DE MESA VARIEDADE ROSINHA

Braz Antonio Jordão
Sérgio R. Stolf

RESUMO

O contrôle de umidade nos grãos e materiais semelhantes, entre outros fatôres, constitui característica de grande influência na conservação dos produtos alimentícios durante o armazenamento.

Sabe-se que o feijão de mesa, quando expurgado e ventilado, isento de grãos partidos ou perfurados por insetos, e armazenado dentro de uma faixa ideal de temperatura, poderá conservar-se em suas qualidades naturais durante períodos mais ou menos longos, desde que mantido com baixo teor de umidade. No entanto, existe uma faixa-limite máxima de umidade de equilíbrio entre o grão e o ambiente, além da qual pode haver desenvolvimento de certas espécies de fungos prejudiciais ao feijão.

Como nas demais espécies de grãos, há uma proporcionalidade crescente entre a umidade do feijão e a umidade intersticial das sementes armazenadas.

Na umidade relativa de 90%, o feijão de mesa rãpidamente se embolora em pouco menos de duas semanas; a 80% de umidade relativa verifica-se o mesmo fato em um mês, pouco mais ou menos.

O melhor meio de se evitar o crescimento de fungos, é armazenar o feijão em ambiente no qual a umidade relativa do ar intersticial dos grãos seja mantida abaixo de 70%

SUMMARY

SATURATION CURVE FOR DRY BEAN OF ROSINHA VARIETY. *The percentage of humidity and other correlated factors on dry bean seeds influence a great deal the preservation of these foodstuffs during storaging period.*

If the beans are in perfect conditions and if they are kept under ideal temperature, they can be storaged for relatively long periods, as long as the humidity content is low.

There is a proportional relation between the humidity among the beans seeds and the storaging place. If the beans have a relative humidity of 90%, they will rapidly spoil on less than two weeks; if the relative humidity is 80% the same thing will happen on a little more than a month.

The best way to avoid the development of fungus is to keep the beans with a relative humidity under 70%.

INTRODUÇÃO

O feijão é um dos alimentos quase que obrigatório diàriamente na mesa dos brasileiros, tanto naquelas mais abastadas, como nas mais humildes.

A Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, tem dedicado, nestes ultimos anos, muita atenção a essa leguminosa, não poupando esforços de seus técnicos especializados para a resolução do problema relacionado com o baixo rendimento da cultura e a insuficiência da produção, que está aquém do necessário para atender às necessidades do consumo.

No entanto, a par do rendimento e da produção das lavouras paulistas de feijão, o problema também necessida de ser resolvido no âmbito da conservação do

produto. O feijão é um grão leguminoso que pode se tornar "velho" com pouco tempo de armazenagem. É suscetível de deterioração por várias espécies de fungos, quando armazenado em condições ambientes desfavoráveis principalmente em relação à umidade.

Muitos são os estudos e as pesquisas necessários ao bom armazenamento do feijão sêco, ressaltando-se, dentre êles, aquêle relativo ao teor de equilíbrio entre o conteúdo de umidade do grão, com a umidade relativa ambiente.

Conhecidas as umidades ideais de equilíbrio entre o grão e o ambiente, pode-se encontrar as condições para uma boa conservação do produto por períodos mais longos, evitando-se o ataque do grão por fungos, que se constituem em importantes agentes deterioradores.

O ataque de fungos no feijão é determinado pela umidade do grão e pelo tempo de armazenamento, ao mesmo tempo que há uma redução na porcentagem de germinação, assim como outros danos ao embrião (2). As amostras de feijão apresentando sementes quebradas, foram atacadas mais rápidamente do que aquelas com sementes não danificadas, originando disso maior perda de germinação e maior número de plantas anormais.

Um teor de umidade entre 12 e 14% assegura bom armazenamento ao feijão, durante um tempo de aproximadamente 7 meses, visto que impede o ataque de fungos, conserva a côr da casca e não afeta o valor da semente.

MATERIAL E MÉTODO

Utilizou-se, para estudo, feijão de mesa da variedade Rosinha, em estado limpo, expurgado e ventilado.

Amostras representativas do feijão, de pêso e umidade inicial conhecidos, foram colocadas em ambientes com diferentes umidades relativas, em dessecadores, obtidos por meio de soluções de ácido sulfúrico, desde 0 até 100%, variando a intervalos de 10 em 10%. Procedeu-se, a seguir, a intervalos regulares, a pesagem rigorosa das amostras, até se obter o máximo de saturação em cada caso.

Com os dados obtidos foi construída a curva de saturação da Figura 1.

Na determinação do teor de umidade usou-se o método preconizado pela Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), isto é, determinação em estufa comum, automática, a 100-110°C, durante 24 horas, em relação ao pêso úmido.

Desenvolvimento de fungos

A constatação de aparecimento de fungos foi feita apenas por observação visual, caracterizada pela formação de micélios e espórios recobrindo as sementes.

RESULTADOS

Nos Quadros 1 e 2, são mostradas as variações nos teores de umidade dos grãos de feijão, em relação ao pêso úmido e sêco, em ambientes com diferentes umidades relativas, em função do tempo.

Amostragem

Pêso úmido g	Pêso sêco g	Teor de umidade %
17,2614	14,8495	13,97
15,8235	13,6167	13,95
16,8338	14,4939	13,89
14,8435	12,7819	13,89
16,0643	13,8241	13,95
	Média.....	13,93

Após cêrca de 4,5 meses, com pesagens periódicas a intervalos crescentes de tempo, observaram-se os equilíbrios entre as umidades relativas ambientes, de acôrdo com os valores abaixo:

HR	Hu	Hs
%	%	%
40	7,23	7,79
50	8,87	9,73
60	10,35	11,52
70	12,51	14,30

Nas umidades relativas de 90 e 80%, as sementes de feijão começaram a embolorar-se após 12 e 33 dias, respectivamente.

A umidade relativa igual ou menor que 70%, ofereceu, nas condições do ensaio, resultados seguros contra o ataque de fungos.

CONCLUSÕES

Existe uma proporcionalidade crescente entre a umidade do feijão e a umidade relativa ambiente, como mostram os Quadros 1 e 2 e os Gráficos da Figura 1.

Em acondicionamento não hermético, em ambientes com umidade relativa igual ou maior do que 80%, o feijão embolora-se fàcilmente. Entretanto, o acondicionamento do produto com teor de umidade ideal, mediante emprêgo de embalagem hermética, pode evitar o emboloramento em zonas de alta umidade relativa.

Quadro 1. Variação do teor de umidade de feijão Rosinha em ambientes com diferentes umidades relativas, em relação ao pêso úmido. (Temperatura média 25ºC) .

Umidade relativa do ar em %	21/10/69	24/10/69	27/10/69	3/11/69	14/11/69	21/11/69	1/12/69	19/12/69	29/12/69	8/1/70	8/2/70	30/3/70
10	13,93	8,08	6,37	4,47	3,80	3,66	3,45	3,27	3,20	3,12	2,99	2,83
20	13,93	9,23	7,57	5,85	5,46	5,38	5,25	5,16	5,13	5,04	4,98	4,95
30	13,93	9,80	8,31	6,89	6,60	6,56	6,45	6,41	6,36	6,27	6,20	6,14
40	13, 93	10,89	9,46	7,96	7,67	7,61	7,47	7,41	7,38	7,27	7,22	7,23
50	13,93	11,86	10,78	9,52	9,28	9,48	9,14	9,05	9,03	8,94	8,91	8,87
60	13,93	12,72	12,03	11,20	11,06	11,01	10,86	10,79	10,75	10,38	10,73	10,32
70	13,93	13,63	13,35	13,15	13,20	13,15	13,00	12,88	12,88	12,86	12,81	12,51
80	13,93	14,67	14,95	15,56	16,04	16,11	15,94	15,89	15,87	15,68	-	-
90	13,93	16,54	17,69	19,75	21,16	21,35	21,20	21,12	21,18	20,24	-	-
100	13,93	16,93	18,36	21,73	25,35	26,75	28,11	28,87	-	-	-	-

Quadro 2. Variação do teor de umidade de feijão Rosinha, em ambiente com diferentes umidades relativas, em relação ao pêso sêco (Temperatura média 25ºC).

Umidade relativa do ar em %	21/10/69	24/10/69	27/10/69	3/11/69	14/11/69	21/11/69	1/12/69	19/12/69	29/12/69	8/1/70	11/2/70	30/3/70
10	16,18	8,79	6,80	4,68	3,95	3,80	3,57	3,38	3,31	3,19	3,08	2.91
20	16,18	9,45	8,19	6,21	5,78	5,69	5,54	5,44	5,41	5,31	5,24	5,21
30	16,18	10,86	9,06	7,40	7,07	7,02	6,89	6,85	6,79	6,69	6,61	6,54
40	16,18	12,22	10,45	8,65	8,31	8,24	8,07	8,00	7,97	7,84	7,78	7,79
50	16,18	13,46	12,09	10,52	10,23	10,47	10,06	9,95	9,93	9,82	9,78	9,73
60	16,18	14,57	13,68	12,61	12,44	12,37	12,18	12,10	12,04	11,58	12,02	11,52
70	16,18	15,78	15,41	15,14	15,21	15,14	14,94	14,78	14,79	14,76	14,70	14,30
80	16,18	12,19	17,58	18,43	19,10	19,20	18 ,96	18,89	18,86	18,60	-	-
90	16,18	19,82	21,49	24,61	26,84	27,15	26,90	26,77	26,87	25,39	-	-
100	16,18	20,38	22,49	27,76	33,96	36,52	39,11	40,59	-	-	-	-

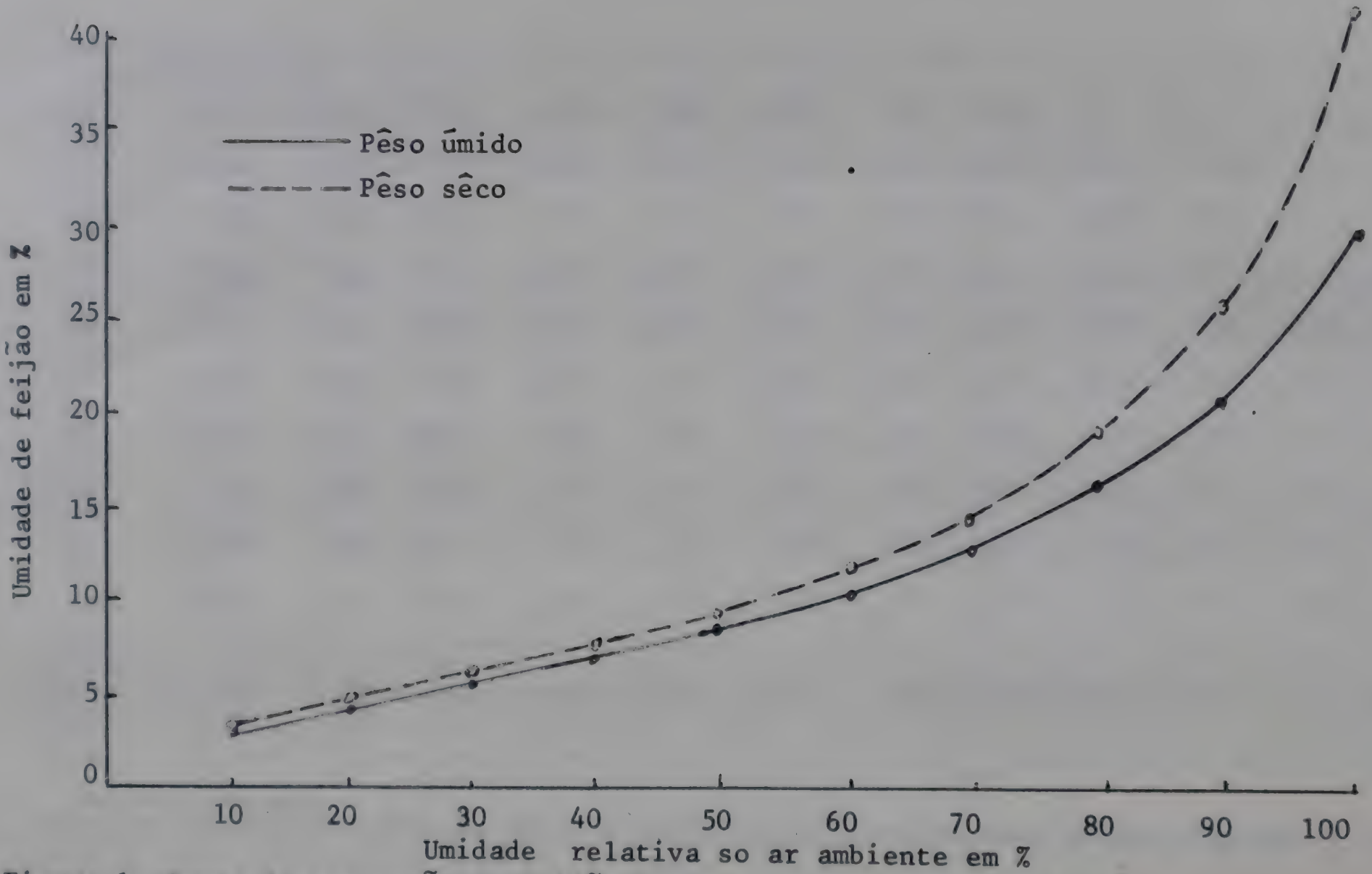


Figura 1. Curva de saturação do feijão Rosinha. Temperatura média 25°C.

LITERATURA

1. LOPES, F. & LUIZ CESAR. Influencia del contanido de humedad,microflora y tiempo del almacenamiento sobre la viabilidad y el aspecto exterior de la semilla de frijol - Agricultura Técnica, 112-115.

2. _____ & CHRISTENSEN, C.M. Effectos del ataque de hongos en el frijol almacenado - Agricultura Técnica p. 33-37.

Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos Vol. 3, 1969/1970

ESTUDOS PRELIMINARES SOBRE O PROCESSAMENTO DO PALMITO DA PALMEIRA BABAÇU

(*Orbignya oleifera* Burret)

Zeno De Martin
Cyro G. Teixeira
Ernesto Bleinroth
Valdemiro C. Sgarbieri
Tobias J. B. de Menezes
José Pio Nery

RESUMO

Para obtenção de palmito do babaçu Orbignya oleifera *Burret, foram realizados estudos no Instituto de Tecnologia de Alimentos, com o objetivo de avaliar-se a possibilidade do seu aproveitamento como matéria-prima para industrialização. O material coletado para estudos, originário dos Estados de Mato Grosso e Goiás, portanto, da espécie* O. oleifera *Burret, era constituído de estipes de palmeiras adultas. Na separação do produto, dificultada pela natureza fibrosa do material, foram obtidos três tipos de matéria-prima, a saber: fibra mole, palmito propriamente dito e "pé". Os pedaços, cortados com faca de aço inoxidável, foram colocados em uma solução de espera, antioxidante, constituída de 1% de ácido cítrico e 0,25% de ácido ascórbico.*

As três frações obtidas do palmito, foram enlatadas em dois tipos de lata, em verniz, de capacidade de 1 quilo, contendo salmoura a 4%, além de 0,4% de ácido cítrico, necessário para baixar o pH do produto final para 4,3. A exaustão das latas foi feita em exaustor de túnel, com injeção de vapor, com a temperatura do centro das latas, na saída do túnel, alcançando 85-87°C. As latas foram recravadas e esterilizadas em água em ebulição, durante um período de tempo de 20, 30, 40 e 60 minutos, seguindo-se de rápido resfriamento.

O melhor produto obtido foi o palmito propriamente dito, constituído da parte mais tenra, podendo-se comparar àquele de palmito-branco (Euterpe edulis). *Não era, entretanto, suficientemente uniforme no aspecto. Utilizando-se, contudo, de palmeiras mais jovens, o palmito será bem mais uniforme e de extração mais fácil.*

SUMMARY

PRELIMINARY NOTES ON THE PROCESSING OF THE BABAÇU PALM HEARTS (*Orbignya oleifera*, Burret). *The raw material used on the experimental trials constituted of babaçu stems coming from the States of Mato Grosso and Goiás, therefore of the species* O. oleifera *Burret, was formed of fully grown trees. In the operation of separating the palm hearts a rather difficult work because of the fibrous nature of the material, three types of raw material were obtained: soft fiber, the properly called palm heart and the "foot". The pieces, cut with stainless steel knives were placed in an antioxidant holding solution, constituted of 1% citric and 0,25% ascorbic acid.*

The three fractions obtained from the palm were canned in two types of cans 1 kilogram, enamelled and plain cans, containing brine at 4% and also 0,4% citric acid needed in order to lower the final product pH to 4,3.

The exhaustion of cans was carried out in an exhauster tunel with steam injection and the temperature in the centre of the can when leaving the tunnel, was 85-87°C.

The cans were sealed and sterilized in boiling water tank for 20, 30, 40 and 60 minutes. Straight

afterwards they were rapidly cooled in chlorinated running water at environment temperature.

The best product was obtained from the softest part of the "palmito" constituted of the properly called palm heart. The product is of good quality and comparable to the white palm heart (Euterpe edulis). *The only problem is that is lacks uniformity in the appearance.*

When younger palm trees palm heart are used the form is more constant and the extraction will be easier.

INTRODUÇÃO

A área do território brasileiro ocupada pela palmeira denominada "babaçu", que compreende, na realidade, duas espécies distintas - *Orbignya Martiana* B. Rodr. e *O. oleifera* Burret - é calculada em cêrca de 14 milhões de hectares, e se estende desde a margem norte do rio Amazonas ao Nordeste e, para o Sul, através do Brasil-Central, até Piraçununga (São Paulo) e Três Lagoas (Mato Grosso).

As maiores áreas de babaçu têm a seguinte distribuição por Estado, em milhões de hectares (1):

Maranhão	8,5
Piauí	1,2
Goiás	1,0
Mato Grosso	0,8

A exploração atual do babaçu consiste no aproveitamento do côco para extração do óleo comestível da amêndoa, que contém de 60 a 65% de óleo. Ambas as espécies são extraídas para êsse fim, porém, em escala muito maior a *O. Martiana*, espécie amazônica, da mata fluvial de terra firme. A *O. oleifera*, o babaçu do Brasil-Central, vegeta em associação com as matas sêcas semidecíduas.

A produtividade dos babaçuais nativos depende da densidade de palmeiras por área. Naqueles excessivamente densos, a produção de côco é baixa. Necessita-se, portanto, para elevar o rendimento de óleo, por área, proceder ao desbaste do palmeiral nativo, reduzindo o número de palmeiras a cêrca de 150 pés por hectare.

Ao proceder êsse desbaste, seria de grande interêsse que se desse algum aproveitamento às palmeiras eliminadas. As duas possibilidades de aproveitamento seriam a celulose do estipe e o palmito.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

As palmeiras da espécie *Orbignya oleifera* Burret foram colhidas em dois locais diferentes, a saber: o primeiro, na região de Tocantinópolis, em Goiás, e o segundo, no ano seguinte, na região de São Pedro, em Mato Grosso. As regiões escolhidas representavam uma área onde o desbaste racional das palmeiras tem sido realizado, para que as plantas mais produtivas possam receber os benefícios de uma maior insolação e aeração e, portanto, produzindo, pela menor concorrência, maior quantidade de côcos por área.

As palmeiras coletadas representavam uma boa amostra da vegetação predominante local, compreendendo indivíduos de diferentes idades de crescimento. Eram, ainda, palmeiras comumente denominadas "macho", isto é, palmeiras que não frutificam, produzindo apenas inflorescências masculinas.

A densidade das palmeiras-babaçu nessas áreas, segundo levantamentos efetuados, variava de 400 a 600 indivíduos por hectare.

Os palmitos, uma vez colhidos, tiveram suas extremidades tratadas com pasta bordalesa, a fim de evitar o desenvolvimento de fungos. Os estipes mostravam-se bastante atacados pela broca-das-palmeiras, ou seja, pelo coleoptero *Homalinotus coriaceus*. O transporte do material até o local do processamento foi feito por caminhão, com uma carga total de 252 palmitos pesando aproximadamente 7 toneladas.

Análise física

Apenas foi efetuada a pesagem dos estipes, em balança comercial Toledo, com a finalidade de permitir o cálculo posterior de rendimento.

Análises químicas

Foram efetuadas as seguintes análises químicas na matéria-prima:

1) pH - Determinação direta por potenciômetro.
2) ATT (acidez total titulável). Determinação por titulometria, segundo o método A.O.A.C. (6).
3) SS (sólidos solúveis). Determinação direta por refratometria.
4) Umidade. Determinação em estufa a 100-105°C, pelo método A.O.A.C. (5).
5) Proteína. Determinação pelo método Kjeldahl, A.O.A.C. (5).
6) Matéria graxa. Determinação por extração em extrator de Butt (5).
7) Celulose. Determinação pelo método da digestão ácida e básica, da A.O.A.C. (6).

8) Cálcio (Ca). Determinação pelo método titulométrico com permanganato de potássio (6).

9) Ferro (Fe). Determinação pelo método colorimétrico com tiocianato (5).

10) Fósforo (P). Determinação pelo método colorimétrico com molibdato - vanadato (6).

11) Carboidrato. Determinação por método indireto = 100 - (proteína + fibra + cinza + umidade + óleo).

Produtos industrializados

Palmito enlatado

As etapas envolvidas nesse processamento foram as seguintes (3, 8):

Descascamento

Primeiramente, para a retirada da casca mais grossa e lenhosa, foram utilizados machado e facões apropriados. Essa etapa do processamento, tôda ela manual, foi de difícil execução devido às características dos estipes da palmeira.

Separação das partes fundamentais

Convencionou-se, para fins de processamento, dividir a porção comestível da palmeira em três partes principais: a) o palmito propriamente dito ou "miolo", que é a parte central tenra; b) a fibra mole, ou seja, a porção fibrosa que recobre o miolo; e c) o "pé" do palmito, de forma cônica, e que corresponde, na palmeira, ao ponto onde se inserem as fôlhas.

Essas porções foram separadas com auxílio de facas de aço inoxidável e imediatamente colocadas em solução anti-oxidante, visando-se a inibir o processo enzímico, que é muito ativo nesse vegetal.

Imersão das porções em solução anti-oxidante

Essas soluções eram de três tipos especiais e assim constituídas: a) salmoura a 6% e ácido cítrico a 1%; b) salmoura a 6% e ácido ascórbico a 0,5%; e c) salmoura a 6%, sem qualquer composto acidificante.

Enlatamento

Os três tipos de produto foram enlatados em dois tipos diferentes de latas, porém, tôdas de tamanho 2 1/2: latas com revestimento interno de verniz sanitário "F" e latas brancas, fôlha COKE, de cobertura 1.25 lb/c.b. Pretendeu-se, assim, estabelecer um estudo comparativo do comportamento do material nos dois diferentes tipos de recipientes.

Adição de salmoura acidificada

A salmoura, como uma concentração de sal de 4%, foi prèviamente aquecida e depois adicionada quente nas latas por meio de uma enchedeira "Burt" de um pistão, regulada para adicionar a mesma quantidade da solução por lata. Foi adicionado, também, ácido cítrico na proporção de 0,4% em pêso, quantidade esta prèviamente determinada em laboratório e necessária para abaixar o pH do produto até 4,3.

Exaustão das latas

As latas, após a adição de salmoura, passaram por um túnel contínuo de vapor, marca "Dixie", durante um tempo de aproximadamente 4 minutos, para a exaustão do ar retido no produto. A temperatura das latas na saída do exaustor, tomada no seu centro por meio de um termômetro de mercúrio, variou entre 85-87°C.

Recravação das latas

Esta operação, que se segue à anterior, foi executada em uma recravadeira semi-automática marca "Eutmann".

Esterilização

Para os três produtos mencionados, foram utilizados dois processos distintos de esterilização, a saber:

a) Esterilização em água em ebulição (processo convencional);

b) Esterilização sob pressão (autoclave) a 121°C.

Os tempos utilizados para os diferentes processos, foram os seguintes: no primeiro, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos; no segundo, 30, 40 e 50 minutos.

Resfriamento brusco em água corrente

Executado em tanque aberto com água corrente clorada até a temperatura final do produto, na lata alcançar 37°C. Evita-se, assim, problema de corrosão externa da fôlha-de-flandres.

Análises químicas e físicas dos produtos industrializados

Para os fins de estudo de estabilidade química e física, foram escolhido os seguintes tratamentos (amostras):

a) $P_1$40 - "miolo" - esterilização em água em ebulição durante quarenta minutos;

b) $P_2$45 - "fibra mole" - esterilização em água em ebulição durante 45 minutos;

c) $P_3$45 - "pé" - esterilização em água em ebulição durante 45 minutos.

Análises químicas

As análises efetuadas foram as seguintes:

pH - determinado diretamente por meio de potenciômetro;

SS (sólidos solúveis). Determinação direta por refratometria;

ATT - (acidez total titulável). Determinação pelo método titulométrico da A.O.A.C. (6).

A - (amido). Determinação pelo método de Ewers, modificado por Hadorn e Doevelaar (4).

Análises físicas

Vácuo. Determinação direta por meio de vacuômetro;

Espaço livre. Determinação direta por meio de uma régua graduada com centímetros.

Para o estudo de vida de prateleira (estabilidade) foram escolhidos os seguintes intervalos de tempo:7, 60 e 180 dias após o processamento. As latas foram armazenadas à temperatura ambiente, em lugar sêco e ventilado.

Contrôle de qualidade dos produtos manufaturados

Foram feitas análises dos produtos processados para verificação de sua estabilidade durante o armazenamento.

RESULTADOS

Análises físicas da matéria-prima

Cálculos de rendimento

Para cálculos de rendimento foi tomada uma amostra de 48 palmitos cujos pesos individuais se acham indicados no Quadro 1.

Quadro 1. Pêso, em quilos, de 48 palmitos da palmeira-babaçu.

Palmito Nº	Pêso kg	Palmito Nº	Pêso kg	Palmito Nº	Pêso kg
1	55,0	17	35,8	33	26,1
2	48,9	18	55,0	34	27,2
3	56.9	19	24,8	35	18,8
4	47,3	20	20,4	36	17,9
5	32,7	21	27,0	37	29,1
6	44,1	22	41,0	38	22,8
7	36,6	23	22,5	39	28,0
8	60,4	24	39,2	40	28,0
9	60,1	25	31,2	41	6,8
10	36,4	26	31,9	42	34,4
11	48,4	27	32,4	43	28,0
12	49,9	28	33,1	44	17,2
13	52,9	29	26,2	45	35,2
14	37,4	30	29,5	46	10,3
15	21,2	31	26,4	47	17,0
16	25,9	32	11,8	48	38,0
			Total		1.587,1
			Média		33,06

Do pêso total dos 48 palmitos, 679 quilos eram de cascas lenhosas e 908 quilos de material que foi processado, ou seja, 42,8 e 57,2%, respectivamente.

Do material utilizado para processamento, obtiveram-se os seguintes pesos e proporções para os seus componentes:

	Pêso	%
Cascas + fibras duras + lenho =	708,0	78,0
Resíduos (casca + fibra dura + madeira) =	117,0	12,9
Matéria-prima para processamento =	83,0	9,1

Do material aproveitável para processamento, isto é, 83,0 quilos, obtiveram-se os seguintes pesos em proporções para as três frações componentes:

Palmito pròpriamente dito	22,0 quilos ou 26,5%
Fibra mole	28,5 quilos ou 34,3%
"Pé"	32,5 quilos ou 39,2%

Considerando-se os 83,0 quilos em relação ao total de material que entrou em processamento, o seu valor corresponde a 9,1%.

Os 22,0 quilos de palmito pròpriamente dito, em relação ao pêso de 908,0 quilos de material que entrou em processamento, correspondem a 2,42%.

Análises químicas da matéria-prima

Segundo as três frações-miolo, fibra mole e "pé" - inicialmente estabelecidos para os palmitos de babaçu, foram obtidos os seguintes resultados para sua composição química indicados no Quadro 2, e que são médias de três repetições por amostra.

Quadro 2. Resultados das análises químicas das frações componentes do palmito de palmeira-babaçu. Médias de três repetições.

Material	pH	SS (%)	ATT (%)
Palmito pròpriamente dito (miolo)	6,30	3,20	0,165
Fibra mole	5.80	2,90	0,173
"Pé"	6,15	4,80	0,167

As análises bromatológicas do palmito pròpriamente dito, efetuadas pelo laboratório de química de alimentos, mostraram os resultados indicados no Quadro 3.

Quadro 3. Composição bromatológica do miolo do palmito pròpriamente dito, da palmeira-babaçu. Médias de quatro determinaçoes em quatro amostras diferentes.

Determinações	Na substância original	Na substância sêca
	%	%
Umidade	88,01	-
Proteína	2.16	18,02
Matéria-graxa	0,56	4,67
Carboidratos	6,61	55,13
Celulose	1,20	10,00
Cinzas	1,46	12,18
Cálcio (Ca) mg/100 g	47	392
Fósforo (P) mg/100 g	54	450
Ferro (Fe) mg/100 g	1	8

Análises químicas dos produtos processados

Nos Quadros 4 a 6, estão indicados os resultados das análises químicas procedidas com os três tipos de produtos (miolo, fibra mole e "pé"), em latas com e sem verniz, aos 7, 60 e 180 dias após o processamento.

DISCUSSÃO

Do ponto-de-vista do processamento industrial, conclui-se que, em relação à solução anti-oxidante de espera utilizada, a solução de salmoura com ácido ascórbico funcionou melhor que as outras duas. A solução de salmoura a 6%, não preservou convenientemente a côr do palmito, que apresentou, após algum tempo, sinais evidentes de ativação enzímica (oxidação). A solução de salmoura e ácido cítrico, embora preservasse a côr do palmito, apresentou um inconveniente que foi justamente a acidificação excessiva dos pedaços em solução, isso devido ao tempo relativamente longo de espera do produto nesta solução anti-oxidante, fato êste que se deve ao processamento lento, em suas primeiras etapas, para a obtenção do palmito de babaçu. Em casos de um processamento mais rápido, ou seja, de uma preparação mais rápida da matéria-prima para o processamento, pode-se, então, utilizar a solução de salmoura e ácido cítrico sem maiores problemas.

Quanto aos ensaios de esterilização, pode-se dizer, basicamente, que o tratamento das latas em água em ebulição se mostrou superior ao tratamento das latas em autoclave, visto que, mesmo para tempos mais curtos, êste último tratamento alterou sensìvelmente a textura, a côr e o sabor do produto. Portanto, o tratamento em água em ebulição deve ser recomendado para êsse tipo de produto vegetal. As causas do escurecimento brusco do produto autoclavado não foram convenientemente determinadas.

Quadro 4. Resultados das análises químicas dos três tipos de produto em latas com e sem verniz, aos 7 dias após o processamento.

Códigos	pH		SS		ATT		A	
	Sem verniz	Com verniz	Sem verniz	Com verniz	Sem verniz	Com verniz	Sem verniz	Com verniz
PP-40	4,30	4,25	4,90	6,2	0,288	0,300	1,21	1,60
P2P-45	4,22	4,15	2,33	2,7	0,368	0,310	1,90	1,47
P3R-45	4,28	4,35	5,4	4,5	0,375	0,280	1,2	1,60

Quadro 5. Resultados das análises químicas dos três tipos de produtos, em latas com e sem verniz, aos 60 dias após o processamento.

Códigos	pH		SS		ATT		A	
	Sem verniz	Com verniz	Sem verniz	Com verniz	Sem verniz	Com verniz	Sem verniz	Com verniz
PP-40	4,32	4,25	4,4	4,3	0,220	0,310	0,40	0,50
P2P-45	3,95	4,20	5,0	4,8	0,210	0,287	0,648	0,776
P3R-45	4,40	4,30	4,6	6,2	0,291	0,137	0,650	0,50

Quadro 6. Resultados das análises químicas dos três tipos de produtos, em latas com e sem verniz, aos 180 dias após o processamento.

Código	pH		SS		ATT		A	
	Sem verniz	Com verniz	Sem verniz	Com verniz	Sem verniz	Com verniz	Sem verniz	Com verniz
PP-40	4,5	4,4	4,4	5,0	0,255	0,255	0,616	1,49
P2P-45	4,15	4,5	5,2	6,2	0,219	0,187	0,66	0,870
P3R-45	4,3	4,35	4,8	5,8	0,205	0,202	1,01	1,11

Em relação ao tempo de esterilização em água em ebulição, para o palmito propriamente dito ou "miolo", o melhor tempo de tratamento, levando-se em conta a textura do produto, foi o de 40 minutos. Para "fibra mole" e "pé", o melhor tempo variou entre 45 e 50 minutos.

Os resultados obtidos nas análises químicas mostraram diferenças que podem ser atribuídas à amostragem, bastante difícil de ser padronizada. Na realidade, o lote processado incluía material de palmeiras com idades variáveis, desde 10 até 60 anos.

Devido às profundas alterações verificadas na côr e textura dos palmitos submetidos à esterilização sob pressão, não foi possível incluir as amostras nos ensaios ou estudos de armazenamento visando à posterior comparação, não só entre embalagens como também entre tratamentos térmicos.

Do ponto-de-vista de estabilidade física do produto, as amostras enlatadas em latas com revestimento interno de verniz resinoso ("F"), resistiram melhor ao produto do que as latas sem verniz, sem variações acentuadas no vácuo das latas.

As latas brancas apresentavam-se, por outro lado, com sinais evidentes de corrosão, com quase ausência de vácuo em algumas amostras após 180 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

Embora não tivesse sido feito um estudo mais preciso das qualidades organolépticas do palmito de babaçu, os resultados obtidos após os seis meses de armazenamento mostram o seguinte:

a) Palmito enlatado (miolo). O produto conseguido foi de muito boa qualidade, bom sabor, boa côr e boa consistência, assemelhando-se muito ao palmito-branco tradicional, amplamente industrializado no Brasil.

b) "Fibra mole". Produto de qualidade aceitável, porém inferior ao primeiro, de textura não muito agradável, parecendo destinar-se melhor ao preparo de um creme ou pasta de palmito. É, sem dúvida, o mais inferior dos três produtos relacionados nesse estudo.

c) "Pé" do palmito. Produto de boa qualidade, boa côr, bom sabor e de textura das mais agradáveis, principalmente quando apresentado na forma de "rodelas" em fatias. Embora inferior ao palmito enlatado (miolo), parece ser um produto de boas perspectivas para os mercados interno e externo, principalmente se fôr preparado na forma de creme, para posterior utilização em maioneses, pastelarias, etc.

Pelos resultados alcançados neste estudo, pode-se concluir que o palmito de babaçu é um produto com boas perspectivas de colocação nos mercados interno e externo, em substituição ao palmito-branco ou na falta dêste. Pode-se supor que, embora não tivesse sido feito um estudo econômico sôbre as possibilidades de industrialização dessa matéria-prima, pois o seu preço não foi possível de ser estabelecido nas condições dos ensaios realizados. No ITAL, as perspectivas de industrialização do palmito de babaçu são bastante animadoras.

Seria recomendável que os resultados obtidos dêsses primeiros estudos fôssem complementados com aquêles de um material mais uniforme, uma vez que a matéria-prima nêles utilizada era por demais variável, principalmente em relação à idade das palmeiras.

Sua seleção, nesses primeiros estudos, foi difícil de ser conduzida, em virtude das dificuldades de acesso aos babaçuais e do transporte da matéria-prima para o local de processamento.

Em observação posterior, verificou-se que, talvez, fôsse mais interessante utilizar material de palmeiras mais jovens, que fornecem palmitos mais uniformes, de melhor textura e extração mais fácil.

BIBLIOGRAFIA

1. BONDAR, G. O babaçu e outras palmeiras produtoras de amêndoas oleaginosas no Brasil. Ministério da Agricultura S.I.A. - 800, Rio de Janeiro, 1954.

2. COOPERCOTIA. Brasil ainda não descobriu o babaçu. Coopercotia, Ano 23, nº 201: 18-25, julho de 1966.

3. DE MARTIN, Z.J. & outros. Estudos preliminares sôbre o processamento do palmito de babaçu. Pesquisas realizadas no ITAL, abril, 1965.(Não publicado).

4. DIEMAIR, W. Laboratoriumsbuch für den Lebensmittelchemiker. Verlag von Theodor Steinkopff. Dresden und Leipzig, 8 Aufl., p. 804, 1963.

5. JACOBS, M.B. The Chemical Analysis of Foods and Food Products. D. Van Nostrand Co., Inc., New Jersey, 3rd ed., 970 p., 1958.

6. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Washington D.C., 10th ed., 958 p., 1965.

7. RIZZINI, C.T. Sôbre a distinção e a distribuição das duas espécies de babaçu *(Orbignya)*. Rev.Brasil. Geografia 25: 313-326, 1963.

8. TEIXEIRA, C.G. Palmito: fino vegetal brasileiro é industrializado em condições precárias. Alimentos e Bebidas 2(3): 12-13, 1966.